Isolierung mehrerer ninhydrinpositiver, hydrolysierbarer Substanzen aus dem Kalbsherzen und Bestimmung ihrer Aminosäurezusammensetzung mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese und der quantitativen Aminosäureanalyse

Hans J. HATZ

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 2014774

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0067

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Nepomuk Zöllner

Isolierung mehrerer ninhydrinpositiver, hydrolysierbarer Substanzen aus dem Kalbsherzen und Bestimmung ihrer Aminosäurezusammensetzung mit Hilfe der Hochspannungs= elektrophorese und der quantitativen Aminosäureanalyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans J. Hatz

aus
Chicago, Illinois USA

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Herbert Nowy

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nepomuk Zöllner

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.10.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen lieben Eltern in Dank

GLIEDERUNG

		Seite:
1.	EINLEITUNG	4
2.	METHODE	7
2.1.	Arbeitsgang	7
2.2.	Extraktherstellung	9
2.2.1.	Versuchsdurchführung	9
2.2.1.1.	Entnahme aus dem Kalb	9
2.2.1.2.	Vorbereitung für Filtration und Homogenisierung	11
2.2.1.3.	Ultrazentrifugation	11
2.2.2.	Auswertung	12
2.2.2.1.	Herzentnahme	12
2.2.2.2.	Auswaschen der Kalbsherzen	12
2.2.2.3.	Homogenisierung	12
2.2.2.4.	Gefrierung	13
2.2.2.5.	Ultrazentrifugation	13
2.3.	Ultrafiltration	15
2.4.	Konzentration und Gefriertrocknen	17
2.5.	Präparative, trägerfreie Elektrophorese	18
2.5.1.	Theorie	18
2.5.2.	Versuchsaufbau	19
2.6.	Gelchromatographie	20
2.6.1.	Theorie	20
2.6.2.	Versuchsaufbau	21
2.7.	Die Hochspannungselektrophorese	23
2.7.1.	Theorie	23
2.7.2.	Versuchsaufbau	23

Seite:

2.8.	Die Präparative Elektrophorese auf Papier	26
2.8.1.	Theorie	27
2.8.2.	Versuchsaufbau	27
2.9.	Hydrolyse	29
2.9.1.	Theorie	29
2.9.2.	Versuchsaufbau	29
2.10.	Aminosäureanalyse	31
2.10.1.	Theorie	31
2.10.2.	Versuchsaufbau	32
3.	ERGEBNISSE	34
3.1.	Ergebnisse der Ultrafiltration	34
3.1.1.	Versuchsdurchführung	34
3.1.2.	Auswertung	35
3.2.	Ergebnisse der präparativen, trägerfreien Elektrophorese	36
3.2.1.	Versuchsdurchführung	36
3.2.2.	Auswertung	37
3.3.	Ergebnisse der Gelchromatographie	39
3.3.1.	Versuchsdurchführung	39
3.3.2.	Auswertung	40
3.4.	Ergebnisse von der Hochspannungselektrophorese	41
3.4.1.	Versuchsdurchführung	41
3.4.2.	Auswertung	41
3.4.3.	Isolierung der Peptide	42
3.4.3.1.	Versuchsdurchführung	42
3.4.3.2.	Auswertung	45
3.5.	Ergebnisse der präparativen Elektrophorese auf Papier	47
3.5.1.	Versuchsdurchführung	47
3.5.2.	Auswertung	49

		Seite:
3.6.	Hydrolyse	52
3.7.	Kristallisation	54
3.7.1.	Theorie	54
3.7.2.	Versuchsdurchführung	54
3.7.3.	Auswertung	54
3.8.	Ergebnisse der Aminosäureanalyse	56
3.8.1.	Versuchsdurchführung	56
3.8.2.	Auswertung	57
4.	DISKUSSION	61
5.	ZUSAMMENFASSUNG	66
6.	ABBILDUNGEN #10-31	68
7.	BIBLIOGRAPHIE	89

1. EINLEITUNG

Warum "Myokardiologie"? Diese Frage stellt W. Raab in seinem Vorwort zu dem Buch "Myocardiology".[39] Darin versucht er die wissenschaftliche Medizin zu alarmieren, daß es in der heutigen westlichen Medizin geradezu paradox ist, wie wenig Herzmuskelforschung betrieben wird in Relation zu der Häufigkeit der Herzmuskelerkrankungen, die immer noch als Todesursache Nummer 1 gelten. Er fordert Wissenschaftler auf, die "Mikrofakten" über das Herz, d.h. biochemisch, sowie histologisch und physiologisch, aufzudecken und damit der Präventivmedizin zugänglich zu machen.

Gerade für die biochemische Untersuchung des Myokards muß der Vorwurf von Raab besonders gelten. Weitreichende Untersuchungen an Uterusmuskulatur, sowie an glatter und quergestreifter Muskulature von Wirbellosen- und Wirbeltieren sind in der Literatur beschrieben. Herzmuskeln wurden bisher hauptsächlich hinsichtlich des Stoffwechsels der respiratorischen Systeme und des Gehalts an Enzymeinheiten der Glykolyse untersucht. Untersuchungen über Proteine und ihre Untereinheiten Peptide(Eiweisse unter 100 Aminosäuren), sind in der Literatur nicht sehr häufig zu finden[4].

Obwohl in tierischen Zellen eine Vielzahl von Peptiden in freier Form vorliegen, besteht über deren biologische Bedeutung in vielen Fällen noch keine Klarheit.

Einige natürlich vorkommende Peptide, sind Hormone, in dazu spezialisierten Zellen gebildet und in kleinsten Mengen in die Blutbahn abgesetzt. In der kardiovaskulären Forschung interessieren gerade vasoaktive Peptide, die erst in den letzten Jahren erforscht wurden und in der Diskussion zur Aufklärung und Therapie des kardiogenen Schocks und der essentiellen Hypertonie im Mittelpunkt stehen.

Diese sind z.B. Gewebshormone, wie das Nonapeptid Bradykinin, das Kallikrein-Kallidin System, das aus einer Vorstufe gebildete Oktapeptid

Angiotensin II, Pitressin, Substance P, Lysomal basic protein, Eledoisin, um nur ein paar zu nennen.[20] Ihre vasoaktive Wirkung basiert auf zwei Mechanismen: eine direkte Stimulierung der glatten Gefäßmuskulartur oder ein permeabilitätssteigender Effekt auf die endotheliale Barriere, sei es dilatatorisch und damit blutdruck= senkend oder konstringierend und damit blutdrucksteigernd.

Neben diesen definierten Substanzen gibt es noch eine Vielzahl von in ihrem Aufbau noch unbekannten vasoaktiven Peptiden. Besonders interessant sind z.B. Peptide im Herzen die von Reader et al[40] untersucht wurden und die angeblich die Nukleinsäure und Protein= synthese im Myokard ankurbeln, damit eine Herzmuskelhypertrophie bei normalen Herzen, die unter Stress stehen, verursacht wird, um dadurch den Blutdruck lange Zeit noch auf genügend hohen Werten zu halten, so daß einer Dekompensation des Herzmuskels vorgebeugt wird.

Ilett[31] konnte von Katzenherzen eine Substanz isolieren, deren Wirkung dem Hormon Aldosteron aus der Nebennierenrinde ähnelt, d.h. auf die Niere einwirkt und durch Erhöhung der glomerulären Filtrations= rate und Nierendurchblutung im Nierenparenchym eine Antidiurese hervorruft. Die Vorstellung, daß ähnliche Peptid aus dem Myokard eine vasoaktive Wirkung auf den Kreislauf haben könnten, ist interessant, wenn man sich vorstellt, daß diese in der Pathogenese des kardiogenen Schocks eine wichtige Rolle spielen könnten. Beim kardiogenen Schock kommt es bekannterweise, während Zuständen mit Versagen der linksventrikulären Ejektion(Herzinfarkt, Arrhythmien) und der linksventrikulären Füllung(Herztamponade, masssive Lungen= arterienembolie) zu einem Abfall von Herzzeitvolumen und arteriellem Druck und meistens zu einem Anstieg des zentralen Venendruckes.

Buczko[11] et al, gelang es niedermolekulare dialysierbare Peptide aus Kalbsfibrinogen zu isolieren, die an isolierten Rattenherz = vorhöfen einen positiv-chronotropen Effekt hatten.Dieser Effekt

konnte durch Steigerung der Dosis verstärkt werden und war nicht durch den medikamentös verwendeten Betablocker Propanolol zu hemmen. Er zeigte, daß diese Wirkung auf eine Erhöhung der Konzentration von zyklischem AMP(bekannt als "second messenger" in vielen Stoffwechselvorgängen, wo es als Aktivator oder Hemmer der ersten reaktionslimitierenden Schritte dient) zurückzuführen ist.

Glenn et al[22], fanden im Plasma von Hunden im kardiogenen Schock einen "myocardial depressant factor"; sie vermuteten, daß dieses niedermolekulare Peptid(MW ca. 800 vis 1000) beim Herzinfarkt durch Stimulation von Gewebsaktivatoren aus dem Bereich einer thrombosierten Koronararterie von Lysosomen im Splanchnikusgefäßgebiet produziert wird, und das dieses Peptid zum pathogenetischen Ablauf des kardiogenen Schockes beiträgt.

Die Hypothese, daß bestimmte Peptide im Herzmuskel existieren, die infolge eines pathologischen Geschehens am Herzmuskel selbst (z.B. Infarkt) freigesetzt werden und am kardiogenen Schocksyndrom beteiligt sein könnten, wurde schon früher erörtert.

Eine Arbeitsgruppe um Nowy[18] isolierte aus dem Homogenat von Kalbsherzen Stoffe, die entsprechend ihrem Molekulargewicht als Peptide angesehen werden konnten, und testete ihre Wirksamkeit auf den Kreislauf des Kaninchens. Bei diesen Versuchen handelte es sich jedoch nur um nicht genauere definierte Substanzen, die in Kaninchen injiziert und deren akuter Effekt auf den arteriellen Blutdruck und die Schlagfrequenz des Herzens untersucht wurden.

Aufgabe der eigenen Untersuchungen, ist die Isolierung und Reindarstellung einer Reihe von Peptiden, deren Auswahl sich aus praktischen Gründen ergab, wobei die elektrophoretische Mobilität unter bestimmten Bedingungen zu Grunde gelegt wurde.

Wir benutzten bei unseren Untersuchungen zur Gruppentrennung die Methoden der Ultrafiltration, trägerfreien Elektrophorese und Gelchromatographie und zur Herstellung eines möglichst reinen Präparates, die Hochspannungselektrophorese.

2. METHODEN

2.1. (ARBEITSGANG)

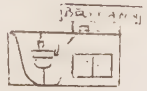
Kalbsherzentnahme: KH 78 (Bezeichnungsweise)

Homogenisierung I

Zentrifugation I

Homogenisierung II

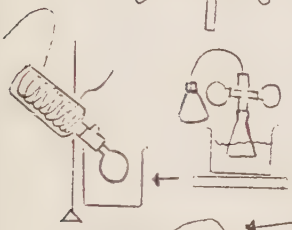
Zentrifugation II



Ultrazentrifugation

Fett dekantiert

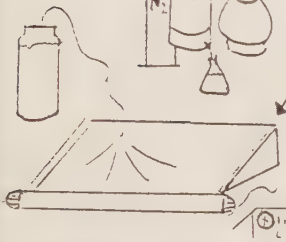
Überstand lyophilisiert und tiefgefroren



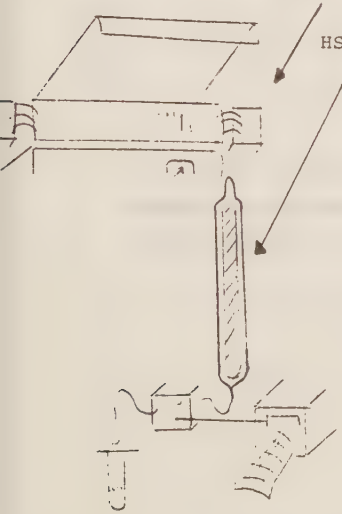
10%-Lösung Ultrafiltration: KH 78 UM 05 isoliert

trägerfreie, präparative Elektrophorese

Hochspannungselektrophorese: KH 78 UM 05#15-23 isoliert und KH 78 UM 05#0-13 und #24-25 aufgehoben



Gelchromatographie



HSE: Fraktionen KH 78 UM 05#15-23 GS 10#20-30 und UM 05#15-23 GS 10#1-20 und #30-60

Vertikale präparative Papierelektrophorese (Elphor Va)

HSE: Isolation von Banden B_b, B_d, B_f, B_g, B_h, C_a, C_d

bei pH = 3,6 und
pH = 1,9

Zentrifugation III, Elution

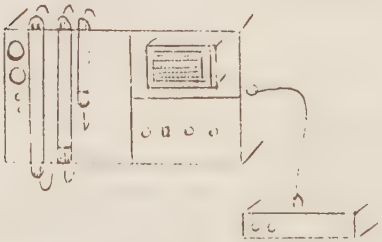
Ultrafiltration III

Konzentrierung, Trocknung, Wägung

Säurehydrolyse

HSE: Identifikation der Aminosäuren

Aminosäureanalyse des hydrolysierten Materials



Kristallisation des isolierten Materials

HSE: Endgültige Prüfung der Reinheit der isolierten Banden (B_b, B_d, B_g, C_a, C_d)

2.2. Extraktherstellung

2.2.1.1. Entnahme aus dem Kalb

Versuchsdurchführung.

Es wurden in zwei Sitzungen insgesamt neun Kalbsherzen im Schlachthof München, unmittelbar nach der Schlachtung des Kalbes, entnommen. Der Grund für die Entnahme einer so großen Menge Herzmuskel war, daß man später bei der Endisolierung der gesuchten Peptide nicht im Mikrogramm- sondern im Milligrammbereich arbeiten wollte.

Dieser erste Schritt, nämlich die Herzentnahme, mußte schnell durchgeführt werden, denn nach Untersuchung von Kronmann[34] setzen die Veränderungen im Myokard postmortem sehr schnell ein. Dieses führt zur Veränderung des chemischen Milieus und damit zur Zersetzung von Eiweiß. Man muß das Herz sofort säubern und einfrieren, bevor es zum Rigor Mortis, bzw. zur Kontraktur kommt.

Die Herzen wurden unmittelbar oberhalb der Abgänge der Koronarien von der Aorta abgetrennt. Mit einer 100 ml. Kolbenspritze wurden die Kranzgefäße mit lauwarmem NaCl o,9% durchgespült, bis das Herz blass wurde und sich somit kein Blut mehr in der Muskelwand befand. Dann wurden die Herzen eingewickelt und in ein Dewargefäß mit Trockeneis(-79° Celsius) gelegt. Es vergingen keine 10 Minuten von der Entnahme bis zur Tiefkühlung. Von nun an wurde das Material immer, auch bei den späteren Versuchen mit der Elektrophorese und Gelchromatographie, bei mindestens -20 Grad Celsius, tiefgefroren gehalten. Dieses war auch sehr wichtig, um eine bakterielle oder pilzliche Kontamination zu vermeiden.

Im Labor wurden die Herzen bei 0 Grad Celsius präpariert und Bindegewebe, Gefäße und Fett entfernt. Dann wurden die Herzen in Streifen geschnitten und abgewogen.

Das Gewicht der einzelnen Herzen(Kammer und Vorhofmuskulatur zusammen) betrug:

Tab. 1. Gewicht der entnommenen Kalbsherzen

Herz	Gewicht	Entnahmetag
1	557,3 g.	05.6.1978
2	545,0 g.	05.6.
3	591,0 g.	05.6.
4	519,0 g.	26.6.
5	622,2 g.	26.6.
6	522,1 g.	26.6.
7	372,3 g.	26.6.
8	670,4 g.	26.6.
9	662.5 g.	26.6.

Gesamt: 5,471,8 g.

2.2.1.2. Vorbereitung für Filtration, Homogenisierung und Ultrazentrifugation

Das gewonnene Material wurde mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:1 vermischt und 10 Minuten lang homogenisiert(Homogenisator E. Bühler, Tübingen, 7000 Umdrehungen pro Min.) Um noch weitere Bestandteile aus dem Herzen zu gewinnen, wurde das Gemisch im Kühlschrank bei +4° Celsius 18 Stunden lang mit einem elektrischen Rührer bewegt.

Darauf wurde das Homogenat 20 Minuten lang bei 3200 g zentrifugiert(Kühlzentrifuge Christ, Osterode Typ 2 KS). Das abgetrennte Sediment wurde dann nochmals, diesmal jedoch mit einer leistungsfähigeren Maschine(Ultra-Turrax Janke u. Kunkel KG, IKA Werke) mit 20,000 Umdrehungen/min. homogenisiert. Dann wurde bei 3500 x g nochmals zentrifugiert, um möglichst viel Stoff zu gewinnen. Bei der zweiten Zentrifugation wurde das Sediment mit 800 ml. Aqua bidest. aufgeschwemmt. Dann wurde das gewonnene Zentrifugat durch einen Teflonfilter geschüttet, um die Lösung von groben Partikeln zu befreien. Es blieben nach dieser Prozedur ca. 8100 ml. Extrakt übrig.

2.2.1.3. Ultrazentrifugation

Nun wurde der Extrakt der Ultrazentrifugation unterworfen (Beckmann Modell L2-65 Präparative Ultrazentrifuge, Rotor Typ 19, maximal 19,000 Umdrehungen/min.). Es wurden jeweils 1500 ml. des Extrakts, verteilt auf 6 x 250 ml. Behälter, bei 5 Grad Celsius 180 Minuten lang bei 15,000 Umdrehungen/min.(Mittelwert) entsprechend 35,900 x g.

Dann wurde der Überstand filtriert(Selecta Papierfilter #595,5; Durchmesser: 24 cm. Carl Schleicher KG). Der gewonnene Überstand wurde in Plastikbehälter gegossen und eingefroren. Aufbewahrt wurden die Gefäße in einem Eisfach bei -20 Grad Celsius. Das Sediment wurde verworfen.

Auswertung.

2.2.2.1. Herzentnahme

Um eine bakterielle Zersetzung und enzymatische post-mortale Veränderung bei den Kalbsherzen zu verhindern, muß man nach Gallo[12] die Zeit nach der Herzentnahme bis zu Kühlung so kurz wie möglich halten. Dabei ist vor allem wichtig, daß die Herzen so schnell wie möglich gefrieren[44] und immer im gefrorenem Zustand aufbewahrt werden.[11]

2.2.2.2. Auswaschen der Kalbsherzen

Das gründliche Auswaschen der Herzmuskel ist sehr wichtig, da es sonst später zu deutlichen Veränderungen im Pherogram kommen kann, wenn große Mengen von Blut noch im Gewebe vorhanden sind. Bei kleinen Beimischungen von Blut ist es aber nach Bauer[5] kein kritischer Fehler, z.B. in den "muskelcharakteristischen" Eiweißbanden zu erwarten. Heteny[27] zeigte, mittels markierter Blutkörperchen,daß nach gründlichem Auswaschen nur noch 1 Prozent des Blutes im Muskelgewebe nachweisbar sei.

2.2.2.3. Homogenisation

Untersuchungen bewiesen, daß nach der Homogenisation und anschließender Dilution im Wasser, im Verhältnis 1 zu 1 die Muskelfasern den Prozess der Synerese durchlaufen und dadurch aus der Muskelzelle ein "Gewebsaft" herausfließt, der sämtliche Komponente des glykolytischen Systems, sowie sarkoplasmatische Proteine enthält.[4]

2.2.2.4.

Kronman[34] konnte durch elektrophoretische Untersuchungen an Proteinen, gewonnen aus Kalbsmuskulatur, zeigen, daß durch die Lagerung von Muskeln bei Temperaturen von -20 Grad Celsius es zwar zu einer Verringerung der Extraktionsausbeute bei nachfolgender Ultrazentrifugation und Elektrophorese der Proteine kommt(Er vermutete dies sei auf die Wirkung von natürlich vorkommenden Enzymen der Muskulatur zurückzuführen).

Hughes[29] und Bailey[4] zeigten jedoch keine nennenswerte Veränderung der Pherogramme, weder durch die Lagerdauer(bis zu 2 Monate bei -20 Grad C.) noch durch die Aufbewahrung(eingeengte, unverdünnte Extrakte 1 zu 10 und 1 zu 100 verdünnt), noch durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren Heteney[27] empfiehlt sogar die von uns angewandte Schnellmethode zur Tief= gefrierung, nämlich die Behandlung der Muskeln mit gefrorenen CO_2-Schnitten. Er konnte zeigen, daß CO_2 keine Veränderungen verursacht.

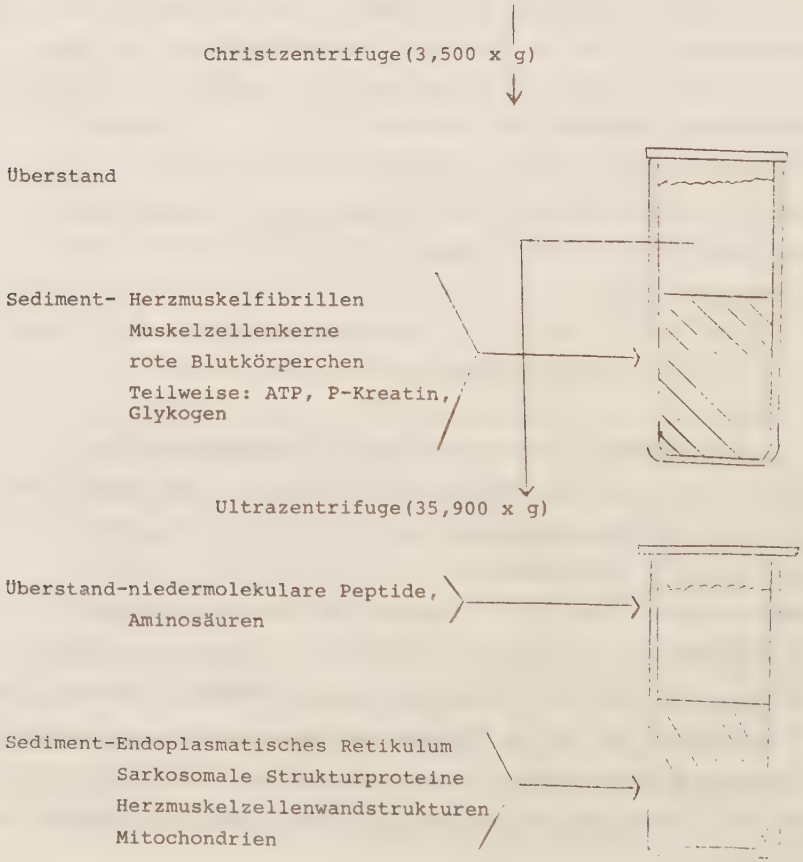
2.2.2.5. Ultrazentrifugation

Nach Harmann[26] bleiben schon bei 80 Umdrehungen/Minute im Sediment Fragmente der Herzmuskelfibrillen, Kerne der Muskelzellen, sowi rote Blutkörperchen zurück. Darin enthalten ist auch der Teil des ATPs, Phosphokreatins und Glykogens, der während der Gewebsfragmentation mit dem Homogenisator aus der Muskelzelle verlorengegangen ist. Hulsmans[30] zeigte, daß nach 3 Minuten bei 800 x g, sich die Kerne und Myofibrillen im Sediment befanden. Bei 20 Minuten und 12,500 x g befanden sich die sarkosomalen Struktur= proteine im Sediment.Bei 6000 x g befanden sich Mitochondrien im Sediment, wobei sich im Überstand noch Endoplasmatische Retikuli und

Ribosomen befanden.

Die Ergebnisse der Zentrifugation und Ultrazentrifugation lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Der Mittelwert von 15,000 Umdrehungen und einer Zentrifugalkraft von 35,000 x g, die bei der Ultrazentrifugation mit der Beckmann Ultrazentrifuge erreicht worden sind, wurde anhand von Nommogramme extrapoliert, welche die verschiedenen Daten innerhalb der rotierenden Behälter wiedergeben.[6] Anhand dieser Daten sind die vorher genannten Trennungsergebnisse zu erwarten:



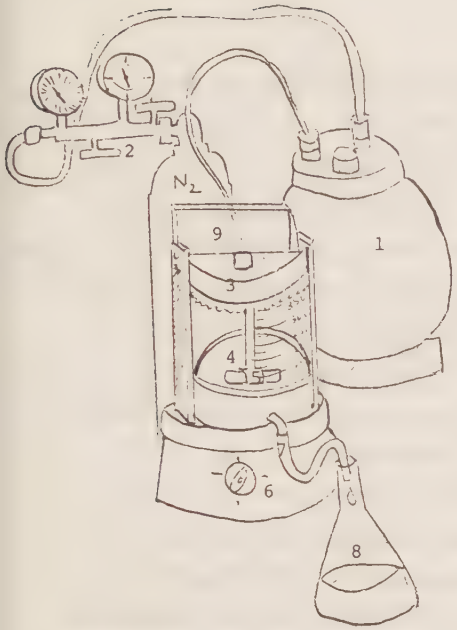


Abb. 1.

2.3. Ultrafiltration

Da nur niedermolekulare, eiweißfreie Bestandteile des Myokards zum Versuch gebraucht wurden, mussten Substanzen ab einem bestimmten Molekulargewicht elimi= niert werden. Dies geschah, in dem schrittweise Kalbsherzextrakt aufgetaut wurde und als 5%-ige Aqua-bidest. Lösung der Ultrafiltration mit Diaflo-Membran= filtern,der Firma Amicon zugeführt wurde. Das Kalbsherzzentrifugat wurde in einen grossen Behälter(siehe #1 Abb.1), der als Extraktreservoir oder "Bombe" bezeichnet wird(Fassungsvermögen 5 Liter) hineingeschüttet und über Plastikschläuche unter einem Gasdruck von 3,5 atü(#2 Abb.1= Stickstoffgasflasche) in die "Zelle"(#3) und damit durch verschiedene Filter(#4) gepresst. Dabei fließen je nach Art des nachgeschalteten Filters unter der treibenden Kraft des hydrostatischen Druckes Lösungsmittel und kleine Moleküle der Lösung durch die Membran; gleichzeitig werden grössere Moleküle von der Membran zurückgehalten. Welche Molekülgrössen durch die verschiedenen Membranen durchgelassen werden,hängt von ihrem Porendurch= messer ab. Da die Durchflussrate von Konzentration, Grösse, Art und Dif= fusionsverhalten der Lösung abhängt und um eine Verstopfung der Filter= poren zu verhindern, wurden zuerst grobere Filter mit einem grösseren Porendurchmesser und dann feinere mit einem kleineren Porendurchmesser benutzt. Um Ionenstärkeveränderungen zu vermeiden, wurde kontinuierlich filtriert, d.h. die Flüssigkeit wurde bei konstanten Volumen nur immer durch die gleiche Menge Extraktlösung ersetzt, die als Ultrafiltrat aus= trat. Dies ist die schonendste und schnellste Methode[1]. Um die Abtrenn=

leistung zu erhöhen, wurde am Schluss einer Ultrafiltration mit einem bestimmten Filter das übriggebliebene Volumen in der Zelle auf das 4-fache mit dest. Wasser wieder erweitert und wieder filtriert. Dabei konnte man die kleineren Moleküle, die durch die auftretende Konzentrationspolarisation der Makromolekülen bei der Permeation behindert werden, noch im Ultrafiltrat gewinnen. Durch dieses Verfahren konnten wir unseren Extrakt zwischen 80 und 90% von den gesuchten niedermolekularen Substanzen befreien(nach Amiconberechnungen[1]). Um zu verhinderen, daß die makromolekularen Stoffe durch Sedimentation die Membran verstopften, wurde ein Rührkern(Abb. 1 #5) kontinuierlich durch einen Magnetrührer(#6) in Bewegung gesetzt. Das Ultrafiltrat wurde über einen Schlauch im Boden der Zelle(#7) aufgefangen und dem Auffangkolben(#8) zugeleitet. Die Ultrafiltration wurde in einem Kühlschrank, bei +4° C., vorgenommen um einer bakteriellen Besiedlung des Eluats vorzubeugen. Nach längerem Gebrauch mußte der Filter auf die Unversehrtheit seiner Oberfläche hin überprüft werden. Wenn er irgenwie beschädigt war, mußte er ausgewechselt werden, ansonsten wurde er regelmäßig gereinigt und mit Satinasept^{R} desinfiziert.

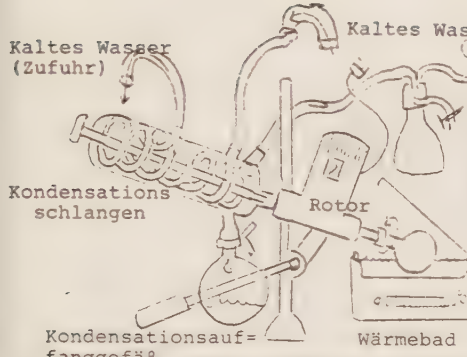


Abb. 2 Rotationsverdampfer

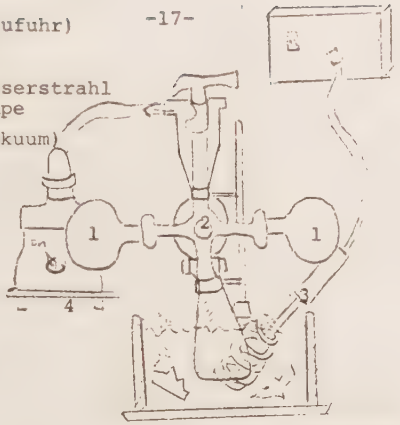


Abb. 3 Gefriertrocknungsmaschine

2.4. Konzentrieren und Gefriertrocknen

Um das Ultrafiltrat-Volumen zu verringern, wurde die Lösung zuerst mit einem Rotationsverdampfer(siehe Abb.2.) auf ein nur kleines Volumen gebracht, daraufhin wurde der Kolben samt Inhalt in Trockeneis eingefroren.

Das Material wurde dann der Gefriertrocknung unterzogen. Dazu wurde der Kolben(Abb. 3 #1) mit einem System verbunden(#2), das mit Hilfe einer Kältemischung von Äthanol, Trockeneis und eines Tauch=kühlers(Colora TK-64) (#3) bei -50°C. bis -60°C. im Vakuum(Öl-Vakuuum=pumpe Vacuubrand Typ RZ 12, Endpartialdruck 6 x 10^{-5} Torr) (#4) das Material gefriertrocknete. Danach wurde das trockene Material gesammelt und bis auf 1/1000 mg. abgewogen. Das gleiche Verfahren der Ver=dampfung und der Gefriertrocknung wurde ebenfalls bei den nach=folgenden Trennungsmethoden benutzt.

MacKenzie[37] konnte zeigen, daß sich bei Gefriertrocknung von Ochsenmuskulature die Zusammensetzung der Strukturproteinen und isolierbaren Peptide nur in einem geringen Prozentsatz, nämlich durch Denaturierung, ändert und deshalb als Extraktionsmethode gute Ausbeute verspricht.

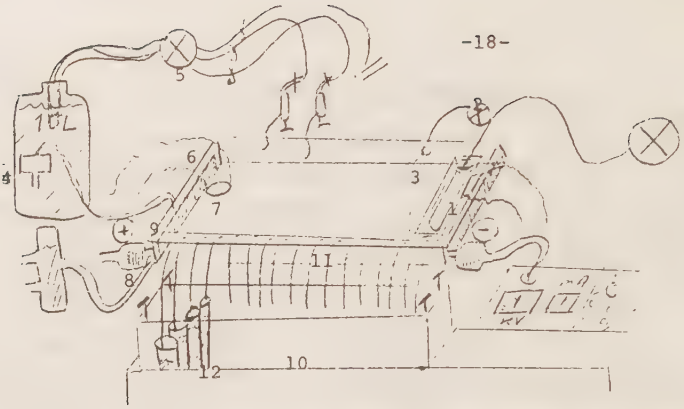


Abb. 4.

Die Va-Maschine.

2.5. Die präparative, trägerfreie Elektrophorese

2.5.1. Theorie.

Die sogenannte präparative, trägerfreie Elektrophorese wurde von Barollier, J.E. Wattke und H. Gibian entwickelt und von K. Hannig vervollkomnet. Es hat sich als eine schonende und schnelle Methode zur Separation von Zellen, Organellen, aber auch von Enzymen und Peptiden bewährt. Es beruht auf dem Prinzip, daß Zelloberflächen sowie Proteine und Peptide charakteristische negative Ladungen und Molekulargewichte besitzen. Führt man z.B. ein Gemisch aus verschiedenen Peptiden in ein elektrisches Feld bei einem bestimmten pH, so trennen sich die einzelenen Peptide auf Grund ihrer Ladung und ihres Gewichtes. Der Vorteil der trägerfreien Elektrophorese ist, daß sie "kontinuierlich" ist, d.h. daß sich Adsorptionseffekte sehr viel weniger störend auswirken als bei der "diskontinuierlichen" Papierelektrophorese, wo das Papier als Verunreinigunsquelle und Adsorbant wirken kann. Die Kräfte die dabei auf die Partikel wirken sollen, sind geringer als bei der Zentrifugation, Papierelektrophorese und andere Trennungsmethoden und damit gilt die Methode als sehr schonend.[24] Dagegen ist eine scharfe Trennung von Banden (gefärbte Peptidstreifen in der HSE), die bei der Isolierung von Peptiden Vorraussetzung ist und mit der Papierelektrophorese geleistet wird, nicht möglich. Diese Methode wurde deshalb nur zur Gruppentrenung und Anreicherung verwendet. Die interssanten Fraktionen wurden dann der Hochspannungselektrophorese auf Papier unterworfen.

2.5.2.

Versuchsaufbau. Benutzt wurde eine ältere Maschine, Elphor VaP die von der Firma Bender und Hobein, München, gebaut worden war(siehe Abb. 4). Das zu trennende Peptidgemisch, vorgekühlt im Kühlschrank, wurde von einem Gefäß(Abb. 4#1) durch einen Plastikschlauch, mittels einer Dosierpumpe(#2) gleichmäßig der Trennkammer(#3) zugeführt. Das Gemisch strömte einer kontinuierlich fließenden Pufferlösung(#4) zu- die als dünne Schicht(#5) zwischen zwei luftgekühlten Glas= platten(#7), quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes bewegt word- Die Trennkammer war nach vorne geneigt um ein Rück= fließen der Lösung zu verhindern. Kontakt zwischen den Elektroden(#8) und dem Pufferfilm vermittelten Membrane(#9), die ständig mit Puffer umspült wurden. Durch eine Vakuumpumpe konnte in festen Zeit= abständen in einer Kammer(#10) ein Unterdruck aufgebaut und dabei über 48 Plastikschläuche(#11) die getrennten Fraktionen aus den Sammelgefäßen der Trennkammer abgesaugt und 48 Reagensgläser zugeführt werden(#12).

Es war immer peinlich darauf zu achten, daß sich keine Luftblasen in der Kammer befanden, sonst hätten sich die Trennergebnisse während eines längeren Laufes vollkommen verändert.

2.6. Gelchromatographie

2.6.1.

Theorie. Da die,uns ab jetzt nur noch interessierende Fraktion-Reagensgläser #15-23(siehe Ergebnisse trägerfreie Elektrophorese) noch Stoffe enthielten,die eine Trocknung verhinderten(es bildete sich als Rest ein wachsähnliches Material) entschlossen wir uns,

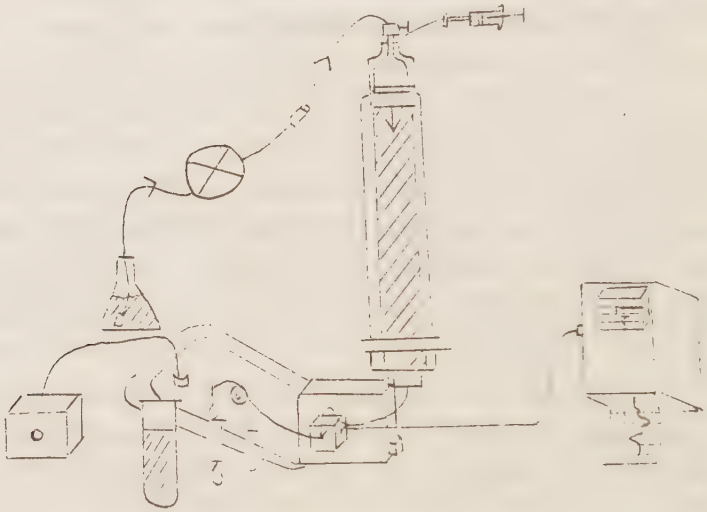


Abb. 5 Gelchromatographieapparatur

das Material einer Gelchromatographie zu unterziehen, mit deren Hilfe wir eine Trennung nach der Molekülgröße vornehmen konnten und hofften damit auch die Trocknung hemmenden Substanzen zu elimi=nieren. Bei diesem Verfahren, auch als Gel- oder Molekularsiebchrom=atographie bezeichnet, erfolgt die Trennung von Stoffgemischen, aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgrösse(und nicht aufgrund des Molekulargewichtes).Da Aminosäuren eine zu ein=

heitliche Molekülgrösse besitzen, können sie mit diesem Verfahren nicht aufgetrennt werden; grosse Bedeutung hat aber dieses Ver= fahren in der Auftrennung von Peptiden und Proteinen gewonnen. Dabei lässt man Gele aus Dextran(Sephadex^{R} ist das verbreiteste Dextrangel [2]) oder Polyacrylamid in Wasser quellen und bringt sie dann in ein senkrecht stehendes Glasrohr ein. Das Wasser innerhalb der Gelpartikel stellt die stationäre Phase, das "äussere" Wasser die mobile Phase dar. Gießt man nun von oben in das Rohr ein Sub= stanzgemisch aus kleinen und grossen Molekülen, so diffundieren die kleinen Moleküle ohne weiteres in die Hohlräume der Gelpartikel hinein, während die grossen Moleküle sich nur im Lösungsmittel zwischen den Gelpartikeln aufhalten, weil ihre Molekülgrösse sie hindert, durch die Poren in die Gelpartikel einzudringen. Die grösseren Moleküle passieren die Säule dehalb schneller und er= scheinen früher im Eluat. Diese Theorie der Wirkungsweise von Dextrangele konnte durch Laurent [36] bestätigt werden. Andrews [2,3] konnte sogar eine praktische Methode zur Berechnung der Molekül= größe entwickeln, indem er zeigte, daß die Elutionsvolumina be= stimmter Verbindungen über einen weiten Bereich von ihrer Molekül= größe abhängen. Es ist deshalb möglich, wenn man die Packungsdichte eines bestimmten Gels und den Durchflussdruck im System kennt, die Molekulargewichte anhand der gemessenen Elutionsvolumina zu schätzen.

2.6.2.

Versuchsaufbau. Wir benutzten bei der Auftrennung Sephadex-Gel G 10(Pharmaca Upsala, Schweden: 40-120µ H_2O Aufnahmevermögen 1,0± o,1 ml/g, Gelvolumen 2-3ml/g trockenes Sephadex). Die Ausschluß=

grenze, d.h. die Grenze der zulässigen Molekulargewichte der zu trennenden löslichen Substanzen, liegt bei diesem Gel bei 700 MW(da unser Gemisch Substanzen mit MW unter 500 enthielt- siehe Ergebnisse Ultrafiltration- war G 10 am geeignetsten für eine scharfe Auftrennung)[9] Eine 1 m.-lange Chromatographiesäule(siehe Abb.6#1) mit einem Fassungsvermögen von 800 ml. und einem Durchmesser von 32 mm. (Säule LKB 4900) wurde mit Sephadex G 10 gefüllt. Die Säule wurde von Aqua bidest.(#2), mittels einer Schlauchpumpe(#3), konstant durchströmt. Das Eluat passierte nach der Chromatographie eine Photozelle(#4), Wellenlänge 253,7 nm.(Uvicord, LKB 4701 A), wurde von einem Fraktionssammler(#5)(Radi Rac, LKB 3400 B) mit halbstündlichen Wechsel der Reagensgläser(#6) aufgefangen und mit einem Fallbügelschreiber(#7)(LKB 6520 A) wurden die Transmissionsänderungen aufgezeichnet.

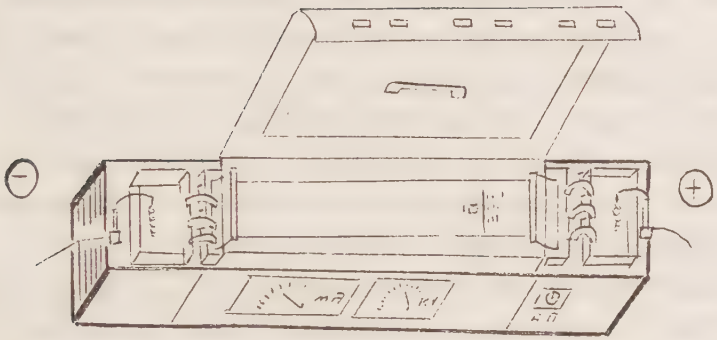


Abb. 6 Die HSE- Maschine

2.7. Die Hochspannungselektrophorese.

2.7.1.

Theorie. Durch das Verfahren der Hochspannungselektrophorese unter Benutzung von verschiedenen, in der Literatur beschriebenen pH-Werten kann eine sehr gute Trennung von Peptiden erreicht werden.[12]

Die geladenen Teilchen- die Gesamtladung der Peptide - wird durch die Summe der einzelnen Ladungen im Molekül bestimmt- und diese bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit.

2.7.2.

Versuchsaufbau. Die verwendete Apparatur(Fa. Hölzl, München) ist eine Entwicklung des Max- Planck-Instituts für Biochemie, München. Die erlaubt das Anlegen von Spannungen bis zu 10,000 Volt bei maximal 400 Watt.

Das Papier liegt bei einer Trennung auf einer

45 cm. x 100 cm. grossen Kupferplatte (siehe Abb. 6 #1), deren Tem= peratur durch eine Kühlvorrichtung konstant gehalten wird. Durch diese Kühlung kann eine Erwärmung des Papiers durch Joule'sche Wärme bis zu einer Stromleistung von 300-400 Watt verhindert werden. Als Trägermaterial wurde ein Filterpapier(#2) von Schleicher und Schüll(Nr. 2043 b) benutzt. Dieses wird während des Versuches mit Pufferlösung eines bestimmten pHs über eine, von einer Pufferwanne (#4) gespeisten Papiermanschette feucht gehalten(#3). Die Manschette wird duch eine Cellophanumhüllung vor Auflösung durch den Puffer geschützt. Diese Wanne ist mit einer zweiten(#5), in die die Platinelektroden(#6) hineinragen, durch gläserne U-Röhre verbunden.

Die Papierbögen für die Elektrophorese wurden auf eine Länge von 1,02 m. aus 100m. Rollen zugeschnitten. Die Auftragstellen des Materials wurden mit einem Bleistift senkrecht zur Laufrichtung eingezeichnet, je nach zu erwartender Wanderungsrichtung und nach verwendeten pHs. Die Streifen wurden dann in eine Wanne mit einem bestimmten Puffer gelegt und durchfeuchtet. Je nach Material und Aufgabestellung wurden folgende Puffergemische benutzt:

a. pH=1,9

   Essigsäure : Ameisensäure : H_2O = 12 : 2,6 : 85,4

b. pH=3,6

   Pyridin : Essigsäure : H_2O = 1 : 10 : 89

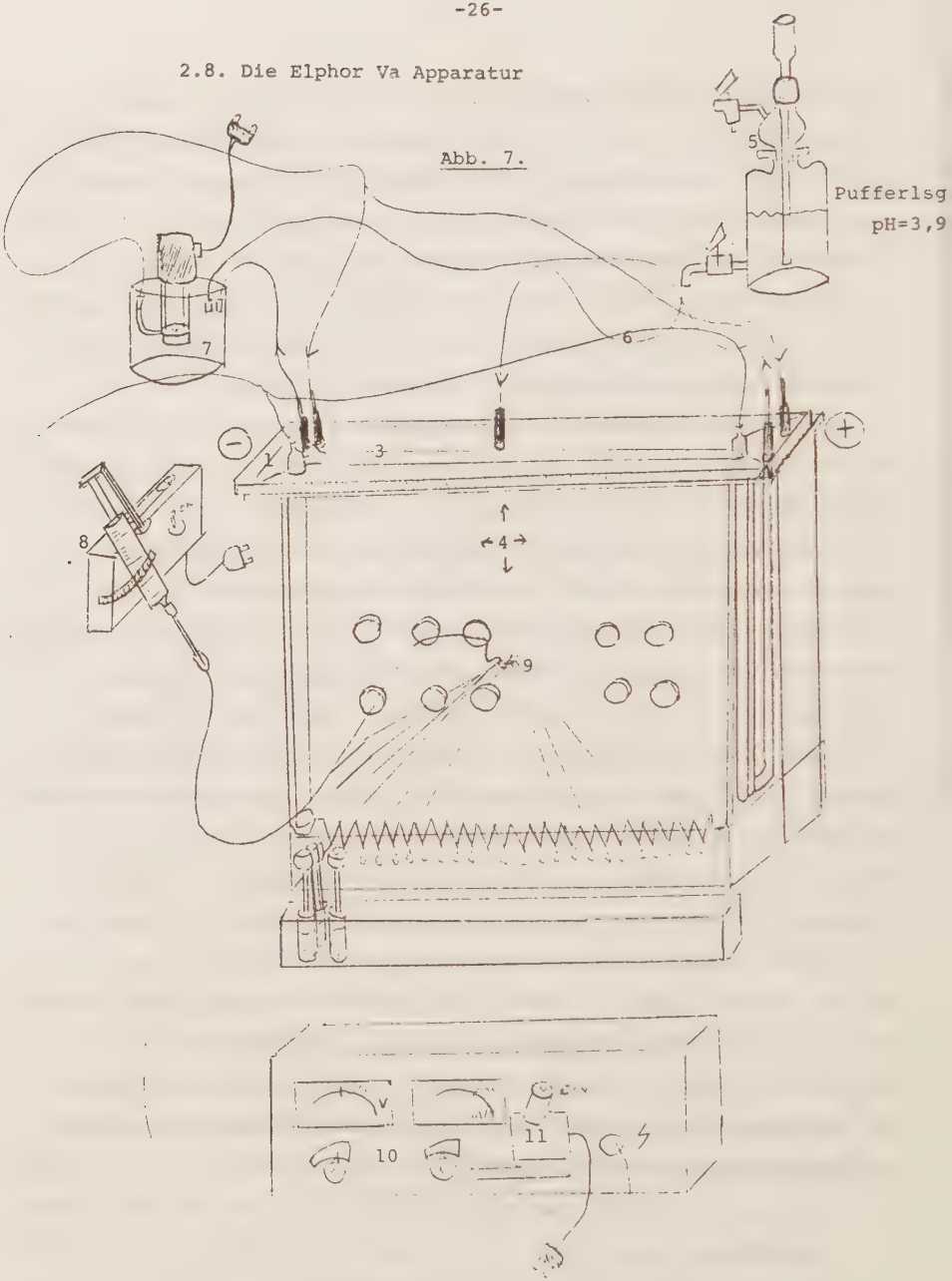
Dann wurden sie sorgfältig mit Filterpapier abgetrocknet. Zum Auf= tragen des zu trennenden Materials wurden selbsthergestellte Pipetten benutzt, die aus starren Polyäthylenschläuchen unter Erhitzung der Enden zu feinen Spitzen ausgezogen waren. Sie wurden anschliessend so geeicht, daß 2 cm. Flüssigkeitshöhe in einer solchen Pipette 10 µl. Substanz entsprach. Das Papier wurde nur mit Einweghandschuhen beim

Auftragen von Substanz berührt. Für jede Auftrennung wurde eine andere Pipette verwendet. Mit einem Lineal wurden die Proben vollkommen gerade und senkrecht zur Trennrichtung aufgetragen. Dann wurde die Kühlplatte mit Papier von Verunreinigungen und Kondenswasser befreit. Der behandelte Papierstreifen wurde auf die vorgekühlte Trennfläche glatt aufgelegt und die Manschetten über den Enden des Papiers mit einem Lineal glattgestrichen. Der Kammerdeckel wurde dann geschlossen und gleichmäßig festgeschraubt(#7).

Nach Beendigung des Versuches wurden die Streifen bei ca. 100° C. im Brutschrank getrocknet und anschliessend gefärbt. Folgende Lösung wurde verwendet: 2 g Ninhydrin, 300 ml. Essigsäure, 40 ml Collidin und Butanol ad 1000 ml. Die Pherogramme wurden mit dieser Lösung besprüht oder, wenn es sich um kleinere Streifen handelte, durch die Lösung gezogen. Die Streifen wurden dann im Brutschrank getrocknet. Dadurch wurden die Banden der Substanzen in verschiedenen Farben sichtbar(siehe Standards A und B, Abb. 10 und 11). Da die Farben innerhalb einiger Tage erheblich verblassten, wurden die Banden mit Buntstiften auf dem Papier festgehalten. Die Ninhydrinfärbung ist die gebräuchlichste Nachweismethode für Aminosäuren und Peptide. Das Reagens erlaubt einen sehr differenzierten Nachweis aller ninhydrinpositiven Verbindungen. Dazu gehören außer Aminosäuren und Peptiden auch Zucker, Ammoniak, Amine, Aminoaldehyde und Allantoin, aber erst in viel höheren Konzentrationen.[13] Zum Anfärben muß noch gesagt werden, daß sie, besonders mit der Ansprühmethode, nicht ungefährlich ist. Einatmen von Pyridin führt zur örtlichen Haut- und Schleimhautreizung und zum Hustenreiz. Es kann sogar zu Erbrechen, Atemnot, Lungenödem und darauffolgendem Schock führen.[15]

2.8. Die Elphor Va Apparatur

Abb. 7.



2.8. Die präparative kontinuierliche Papierelektrophorese (Va)

2.8.1.

Theorie. Als nächste Trennungsmethode wurde eine vertikale Elektrophorese(Va abgekürzt) vorgenommen mit einer Apparatur der Firma Bender und Hobein(Gerät Elphor Va), entwickelt von K. Hannig vom Max Planck Institut, Martinsried.[25] Durch diese ist eine kontinuierliche Trennung von Stoffgemischen möglich. Dabei wird ein feiner Strahl des zu trennenden Gemisches einem Filterpapier von poröser Beschaffenheit, welches quer zu den Kraftlinien eines angebrachten elektrischen Feldes liegt, langsam zugeführt. Es ist im Prinzip ähnlich der von uns verwendeten und schon erklärten trägerfreien Elektrophorese, nur, daß die Transportflüssigkeit der trägerfreien Elpho durch ein poröses Medium von geeigneter Oberflächenbeschaffenheit ersetzt wird. Der Vorteil dieser Methode ist, daß die Verwendung des porösen Systems die Vermeidung von Konvektionsströmungen und die Verminderuung von Diffusionserscheinungen erlaubt.[43]

Mit dieser Methode lassen sich Proteine, Peptide und Aminosäuren auftrennen. Es ergeben sich dabei bessere Trennungen als bei der Verwendung der trägerfreien Elpho, aber der Durchsatz ist hierbei weit geringer, weshalb die Auftrennung sehr zeitraubend ist.[32] Gegenüber der Hochspannungspapierelektrophorese bietet diese Methode den Vorteil, daß man aufgrund der niedrigen Spannung und Stromstärke das Gerät nicht dauernd beobachten muß(dadurch kann ein Versuch nachts und unbeobachtet laufen) und sehr wenig Material verlorengehen kann, da man das Material in Reagensgläser auffangen und nicht aus dem Papier herausschneiden muß, sondern lediglich die Lösungen verdampft.

2.8.2.

Versuchsaufbau.(siehe Abb. 7) Das Gerät besteht aus einem Kunststoffrahmen(#1) der oben eine Pufferwanne zur Aufnahme der Pufferlösung

besitzt(#2), in dem auch eine Haltevorrichtung besteht, die gleichzeitig die Platinelektrode(#3) enthält, zwischen welchen die Filterpapierbögen eingespannt werden(#4). Der herausnehmbare Rahmen ist in einer mit Feuchtigkeit gesättigten Glaskammer(Ausmaße: 35 x 29 x 11 cm.) befestigt. Eine Mariottesche Flasche(#5) sorgt dafür, daß sich mittels Plastikschlauch(#6) eine konstante Menge Puffer in der Wanne befindet. Dieser Puffer geht über die Pufferwanne auf das Papier über und wird nach Durchströmen des Papieres unten durch 42 Reagensgläser aufgefangen. Die Platinelektroden werden kontinuierlich mittels einer Umwälzpumpe(#7) mit Puffer umspült. Das zu trennende Substanzgemisch wird mittels eines Infusomaten(#8) kontinuierlich zugeführt und zwar über einen Plastikschlauch- an dessen Ende eine feine gebogene Kapillare(#9) angebracht ist, welche das Filterpapier berührt.

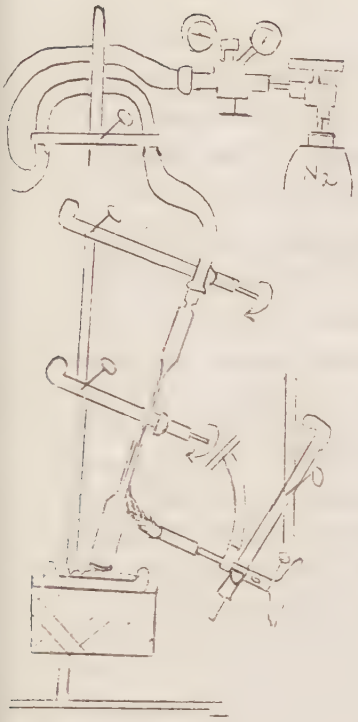


Abb. 8. Hydrolysevorrichtung

2.9. Hydrolyse

2.9.1.

Theorie. Die einfachste Methode, eine Auskunft über die Art und Menge der in einem Protein enthaltenen Aminosäuren zu erhalten, bietet die Totalhydrolyse. Durch die Behandlung mit starken Säuren oder Basen oder durch die Wirkung spezifischer proteinspaltender Enzyme (Proteasen wie z.B. Trypsin) werden die Peptidbindungen gespalten. Die meisten Proteine und Peptide lassen sich vollständig in ihre Aminosäuren aufspalten, wenn sie mehrere Stunden in konzentrierte Salzsäure gekocht werden. Diese Form der Hydrolyse muß unter Luftabschluß durchgeführt werden, um oxidative Nebenreaktionen durch den Luftsauerstoff zu vermeiden.

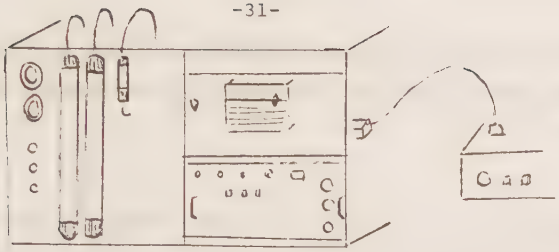
Bei der Säurehydrolyse gehen jedoch Tryptophan völlig und Serin und Threonin bis zu 10% verloren. Außerdem werden Glutamin und Asparagin zu ihren entsprechenden Aminosäuren, nämlich Glutaminsäure und Asparaginsäure, desaminiert, d.h. sie verlieren Ammoniak, das dann im Hydrolysat nachweisbar ist.[41]

2.9.2.

Versuchsaufbau. Die Hydrolyse wurde folgendermaßen durchgeführt: Eine Ampulle(steril verschlossen) wurde am engen Teil des spitzzulaufenden Halses aufgesägt. Die zu hydrolysierende Substanz wurde trocken hineingegeben(etwa 1 mg. reicht), dann 6-N HCl im Überschuß hineingegeben. Eine genau zu beachtende Menge von Salzsäure ist nicht wichtig. Mit einer fein ausgezogenen Kapillare(Pasteurpipette) wurde N_2 in die HCl-Substanzlösung hineingeleitet. Durch den in Abb. 8 aufgezeichneten

Aufbau des Experiments konnte man einen konstanten Strom von N_2 in die Lösung etwa eine halbe Stunde lang durchperlen lassen, ohne daß die Pipettenspitze aus der Lösung sich bewegen konnte; damit war gewährleistet, daß der Sauerstoff aus der Lösung verdrängt wurde. Danach wurde bei weiterhin ausströmendem Stickstoff die Kapillare etwas über den Flüssigkeitsspiegel gehoben. Daraufhin wurde das Substanzgemisch durch das Eintauchen in Trockeneis gefroren. Durch die schiefe Stellung der Ampulle konnte dann N_2 zugeführt werden, das Reagensglas über die Flammenspitze eines Bunsenbrenners gehalten und in der Mitte abgeschmolzen- dadurch luftdicht- verschlossen werden. Dann wurde es im Brutschrank 20 Stunden lang bei 110°C. aufbewahrt. Die Ampulle wurde dann unterhalb des abgeschmolzenen Teiles aufgesägt und der Inhalt in einen Kolben mit Schliffhals übergeführt. Mit Hilfe des Rotationsverdampfers wurde die Salzsäure abgedampft. Die dabei gewonnene Trockensubstanz wurde dann noch zweimal mit Aqua dest. aufgeschwemmt und die Flüssigkeit jeweils wieder abgedampft. Vor der Trennung zum Nachweis der enthaltenen Aminosäuren, wurde die Substanz im Reagensglas über Nacht in einem NaOH-Exsikkator aufbewahrt. Dadurch wurde noch vorhandene HCl-Spuren neutralisiert.

Abb. 9



2.10. Aminosäureanalyse- Ionenaustauschchromatographie

2.10.1.

Theorie. Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetung wurde, zusätzlich zu der schon beschriebenen Methode der HSE, nach dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Ionenaustauscher sind hochpolymere Kunstharze, die aus Elektrolytlösungen Ionen(in unserem Fall Aminosäuren)= mobile Phase, gegen eigene Ionen=stationäre Phase, gleicher Ladung aufnehmen und bei Änderung des pHs der Umgebung wieder abgeben können. Das gleiche Prinzip verwendet man bei der Wasserenthärtung und in der Medizin bei Behandlung von Störungen im Ionenhaushalt.

Zur Auftrennung von Aminosäuregemischen werden Kunstharze benutzt, die zahlreiche Sulfonsäuregruppen(SO_3H-) enthalten. Da diese mit Kationen Salze bilden können, heißen sie Kationenaustauscher. Diese Kationenaustauscher werden bei der Analyse in Säure aufgequollen und in eine Säule(Abb. 9#1) eingebracht. Durch die Quellung bilden sich Hydronium(H_3O^+) ionen, die aber infolge ihrer Ladung bei den SO_3^--Ionen verbleiben. Wenn man jetzt eine saure Aminosäurelösung, bei der die Aminosäuren als Kationen vorliegen, durch den Austauscher laufen läßt, treten die Aminosäure-Kationen an die Stelle der H_3O^+-Ionen. Danach wird mit bestimmten Puffern von steigendem pH nachgespült, wodurch die Aminosäuren auf Grund ihres verschiedenen pKs, Zwitterionenform annehmen. So verändert werden sie nicht mehr so stark an die Sulfonsäuregruppen der Säule gebunden und werden wieder gegen H_3O^+-Ionen ausgetauscht. Die verschiedenen pK-Werte(negativer Logarithmus der Dissoziationskonstante der einzelnen Aminosäuren) der einzelnen

Aminosäuren bewirken, daß sie bei unterschiedlichem pH ihre Zwitter=ionengestalt annehmen und zu verschiedenen Zeitpunkten im Eluat erscheinen.

2.10.2.
Versuchsaufbau. Wir benutzten bei der Ionenaustauschchromatographie das Gerät Durum(Fa. Beckmann). Mit dieser Maschine können Aminosäure=gemische innerhalb von wenigen Stunden analysiert werden. Zur Bestimmung der Aminosäuren in den von uns gewonnenen Hydrolysaten brauchte die Maschine pro Bestimmung nur 90 Minuten. Die Apparatur(Abb. 9) über=nimmt vollautomatisch die Auftragung des Aminosäuregemisches, die anschließende Elution mit verschiedenen Puffern, die Sammlung der einzelnen Fraktionen des Eluats, die Bestimmung des Aminosäuregehaltes jeder Fraktion(photometrische Messung nach Anfärbung mit Ninhydrin=lösung) und die graphische Auftrennung der Ergebnisse auf Millimeter=papier.

Das zu trennende Aminosäuregemisch(Hydrolysat der isolierten Peptide) wurde über ein Schlauchsystem der Ionenaustauschersäule zugeführt(Abb. 9#1). Über ein zweites System wurde der Säule das von uns verwendete Elutionsmittel Natriumcitratpuffer zugeführt. Nach Durchlaufen der Chromatographiesäulen, wurden die getrennten Amino=säuren in einem Fraktionssammler aufgefangen(#2). Dem Puffer-Amino=säuregemisch(bei der Auftrennung wurden zwei verschiedene Puffer verwendet- siehe Ergebnisse) wurde Ninhydrin kontinuierlich zugeführt. Das Gemisch des Eluats mit Ninhydrin floß dann durch eine Kapillar=spirale aus Teflon, die sich in einem siedenden Wasserbad befindet. Die sich dabei entwickelnde Färbung wurde kontinuierlich bei 570 nm und 440 nm gemessen. Dabei wanderte das gefärbte Eluat durch ein Durchlauf=photometer, das die Extinktionen maß und kontinuierlich auf Papier auf=zeichnete(#3). Ein Rechner(Infotronics Integrator Control Board-#4) gab zugleich die integrierte Fläche unter den bei 570 nm gemessenen

Kurven an. Anhand dieser Daten konnte eine qualitative und quantitative Aussage über die Aminosäurengehalte der verschiedenen Peptide gemacht werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse der Ultrafiltration

3.1.1.

Versuchsdurchführung. Benutzt wurden bei der Ultrafiltration zwei verschiedene Zellen der Fa. Amicon, Amicon Modell 202- 200 ml. Inhalt und 27,5 cm^2 Membranfläche. Es wurde bei 7 kg/cm^2 filtriert. Um die Zeit zu verkürzen, wurden zwei verschiedene Zellen benutzt da nach der Ultrazentrifugation 6000 ml. Extrakt übbriggeblieben war. In den zwei Zellen wurden folgende Filter in aufeinanderfolgenden Trennstufen benutzt. Die zugehörigen Daten:

Tab. 2. Ergebnisse der Ultrafiltration.

Trenn=stufe	Modell 402	Modell 202	Molekülgröße oberhalb Membran (in MG)	Molekülgröße in Ultrafil=trat(in MG)	Farbe
I	XM 50	XM 50	größer 50,000	unter 50,000	rot
II	UM 10	PM 10	50,000-10,000	unter 10,000	xantho=chrom
III	UM 05	UM 05	500-10,000	unter 500	farblos

Der Unterschied zwischen PM- und UM- Filtertypen besteht nur darin, daß die PM-Typen wesentlich schnellere Durchflußraten haben als die UM-Typen, und die Trennschärfe etwas geringer als bei den UM-Typen ist, was bei unseren Versuchen nicht stört, weil unser Material weiter in der trägerfreien Elektrophorese und Gelchromatographie aufgetrennt wurde. Es wurde nach jeder Trennstufe der Überstand tiefgefroren und im Kühl=schrank bewahrt. Nur das UM o5-Ultrafiltrat wurde weiter benötigt.

Es konnte insgesamt 16 x 250 ml. Kolben UM 05-Ultrafiltrat gewonnen werden. Für die Ultrafiltration alleine wurde 1 Monat gebraucht. Nach

der Gefriertrocknung ergab sich eine Trockengewichtsmenge von 64,266 g. Dieses Material wurde dann der trägerfreien Elpho unterzogen.

3.1.2.

Auswertung. Nach Amicon [1] und Blatt [8] wird das Protein Myo= globin mit einem Molekulargewicht von 18,000 nach Filtration durch den UM- und PM 05 Filtern zu mehr als 95% zurückgehalten. Im Ultrafiltrat befinde sich damit weniger als 5% des Myoglobins vom Muskelextrakt vor der Ultrafiltration. Hämoglobin mit einem Molekulargewicht von 64,500 ist schon durch den UM- und PM-Filtern zu 98% im Überstand. Daß Hb und Myoglobin im PM 05-Filtrat fast nicht mehr vorhanden sein konnten, konnte man rein optisch feststellen, da sich die Farbe des ursprünglichen Extraktes, von Rot über Gelb zu einer farblosen Flüssigkeit geändert hat (siehe Tab. 2.) Albumin(MG 67,000), Apo-ferritin(480,000) und sämtliche Gammaglobuline(160,000) sind fast zu 100% vom XM-Filter abgetrennt worden. Auch Cytochrome c(12,400) ist nur in Spuren im Ultrafiltrat zu erwarten.

3.2. Ergebnisse der präparativen, trägerfreien Elektrophorese

3.2.1.

Versuchsdurchführung. Es wurden 5 Läufe mit der präparativen, trägerfreien Elektrophorese unternommen. Dabei wurden 6000 ml. Kalbsextrakt 10-%ig(60 g.) aufgeschlossen und in den 48 Reagens=gläser gesammelt. Jedes Röhrchen hatte ein Fassungsvermögen von 115 ml. Die Pufferpumpe(Abb. 4#5) förderte Pufferlösung von 110 ml./h. und die Probendosierpumpe(Abb. 4#2) 6,5 ml./h. der aufzutrennenden Substanz. Das Probengefäß faßte 200 ml. Anhand dieser Daten konnte man berechnen, daß man für einen Lauf 30,8 Stunden benötigte. Die Elektroden wurden von einer Pufferlösung umspült die einen pH von 3,9 hatte und folgendermaßen zusammen=gesetzt war:

Pyridin 60 ml.

Eisessig 20 ml.

H_2O ad 10,000 ml.

Die Pufferlösung, die durch die Kammer strömte, hatte die gleiche Zusammensetzung, war jedoch mit Wasser 1 zu 2 verdünnt. Die angelegte Spannung betrug 1,5 KV mit einer Stromstärke, die zwischen 140 und 150 mA. Die Temperatur in der Trenn=kammer wurde durch ein Kühlsystem konstant auf 7,0° C. gehalten. Bevor der Kalbsherzextrakt der Kammer zugeführt wurde, wurde er 20 Min. lang bei 5,000 U/min zentrifugiert um eventuell nicht gelöste Substanzen zu entfernen, die sonst diese die Trennung stören könnten. Die angelegte Spannung von 1,5 KV mußte anfangs nachgeregelt werden, da die Leitfähigkeit von Puffer und Probe nicht gleich waren und es ca. 30 Minuten dauerte, bis die Probe=lösung von der Auftragsstelle zur Auffangkammer gewandert war.

Die einzelnen Fraktionen wurden einzeln tiefgefroren, konzentriet und gefriergetrocknet. Dann wurde der Inhalt jeder Fraktion der HSE unterworfen. Die Elektrophoresen wurden mit einer Spannung von 6 KV und einer Stromstärke von 50 mA bei einem pH von 1,9 durchgeführt, wobei als Vergleich die bekannten Banden der Standards A und B(Abb. 10) dienten. Die Fraktionen wurden anhand von Ähnlichkeiten der Banden und Bandenzahl zusammengeschüttet. Die Bandenmuster der verschiedenen Fraktionen sind in Abb. 12 aufgezeichnet.

Da in den Fraktionen 1-14(Abb. 12) keine ninhydrin-positive Substanzen nachzuweisen waren, wurden sie der weiteren Untersuchung nicht unterzogen. Es wurden dann die restlichen Fraktionen wieder elektrophoretisch gegen Standard A und B, diesmal bei einem pH von 3,6 aufgetrennt. Die Bandenmuster sind in schematischer Form in Abb. 13 festgehalten.

3.2.2.

Auswertung. Die graphische Aufzeichnung der Bandenanzahl(siehe Abb. 14) der verschiedenen Fraktionen ergab ein charakteristisches Muster, anhand dessen -in Übereinstimmung mit Ähnlichkeiten der Bandenmuster bei pH=1,9 und pH=3,6-die Fraktionen 1-48 folgendermaßen in Gruppen zusammengefaßt wurden:

Tab.3. Gruppenzusammensetzung nach trägerfreien Elpho

Gruppe	Extrakt	Ultrafiltrat	Reagensglasnummer der trägerfreien Elpho
1	KH 78	UM 05	#1-14
2	KH 78	UM 05	#15-23

Tab. 3. cont.

Gruppe	Extrakt	Ultrafiltrat	Reagensglasnummer der trägerfreien Elpho
3	KH 78	UM 05	#24-28
4	KH 78	UM 05	#29-39
5	KH 78	UM 05	#40-43
6	KH 78	UM 05	#44-48

Die einzelnen Gruppen wurden dann der Elektrophorese unterzogen und es ergaben sich die in Abb. 15 festgehaltenen Bandenmuster.

Die Gruppe 3(KH 78 UM 05 #15-23) wurde für die weiteren Unter=suchungen herangezogen, da sie bestimmte Banden-vermutlich saure Peptide enthielt, die schon in früheren Untersuchungen in der Arbeitsgruppe um Nowy zwar im Bandenmuster aufgefallen aber nicht eingehend untersucht worden waren.

3.3. Ergebnisse der Gelchromatographie

3.3.1.

Versuchsdurchführung. Es wurden 22 Auftrennungen -- (GS 10 #I-XXII) -- von der aus der trägerfreien Elektrophorese gewonnenen Fraktion KH 78 UM 05 #15-23 durchgeführt um die gesuchten Substanzen weiter zu konzentrieren und die Begleitsubstanzen zu eliminieren. Anschließend wurde eine Gelchromatographie -- (GS 10 #XXIII) -- von dem gesamten Ultrafiltrat(UM 05) gemacht. Es wurden jeweils 5 ml. einer 10%igen Lösung der aufzutrennenden Substanz hergestellt, dann bei 5,000 U/min. zentrifugiert und vor dem Probenauftrag wurde die Lösung im Kühlschrank gelagert, damit die Substanz keine ungelösten Partikel enthalte und sich als kühle Lösung besser der Geloberfläche anlegen würde. Der Probenauftrag erfolgte mit einer vorgekühlten Spritze(ABB.5#8) an deren Spitze ein 10 cm.-langer Plastikschlauch montiert war. Dabei war zu beachten, daß keine Luftblasen in das System hineinkamen. Es wurde bei jeder Auftrennung das Durchflußvolumen(Volumen in einem Reagensglas nach 30 Minuten) gemessen. Bei der ersten Auftrennung(GS 10#I) wurden 100 Reagensgläser gesammelt um, durch die graphische Aufzeichnung vor der Auftrennung mit der HSE eine Orientierung über den Gehalt an Substanzen in der Lösung zu bekommen. Anhand dieser ersten Kurve(siehe Abb. 16)-bei den nachfolgenden Auftrennungen GS 10#II-XXII verliefen die Kurven genauso- wurden die ersten 60 Fraktionen einzeln mit dem Rotationsverdampfer eingeengt und gefriergetrocknet. Dann wurde mit jeder einzelnen Fraktion aus den Reagensgläsern eine HSE durchgeführt (HSE#16-22). Die HSE's liefen über 6 Stunden bei einer Spannung von 6 KV und 50 mA. Es wurde der pH von 3,6 benutzt, da die uns interessierenden Banden nahe dem neutralen Bereich wanderten(diese

Tatsache wurde festgestellt durch Vergleich der Auftrennung von ÜM 05#15-23 bei verschiedenen pHs in HSE 15). Das Ergebnis ist in Abb.17 festgehalten.

3.3.2.

Auswertung. Die HSEs ergaben, daß die Reagensgläser#1-19 und ab Reagensglas#44 keine ninhydrinpositive Substanzen enthielten. Aus der Vielzahl der Fraktionen wurden #20-30 herausgegriffen. Dieser Bereich, zwischen Asparaginsäure und Glutaminsäure und zwischen Glutaminsäure und der Auftragstelle zeigte eine Vielzahl von Banden. Nach der Bezeichnungsweise von Nowy et al [23] wird der Bereich zwischen Glutamin-und Asparaginsäure als B-Banden-Bereich gekennzeichnet, der Bereich zwischen Glutaminsäure und Auftragstelle als C-Banden-Bereich. In den nachfolgenden Gelchromatographien(Bezeichnung: KH 78 ÜM 05#15-23 GS 10#I-XXII#20-30) wurden die den B- und C-Bereich enthaltenden Fraktionen vereinigt und für die weitere hochspannungselektrophoretische Auftrennung verwendet. Das Gewicht des lyophiliesierten Materials betrug 1,019 g.

In Abb. 18 ist der graphische Vergleich von ÜM 05#15-23 und Ultrafiltrat KH 78 ÜM 05 aufgezeichnet, wobei die zwei Kurven der Gelchromatographie dieser Lösungen(GS I und XXIII) aufeinanderprojiziert sind. Man sieht, daß die ÜM 05#15-23 Fraktion des Gesamtultrafiltrates aus dem Bereich stammt wo sich die Substanzen mit den größten Molekülen und damit auch höchsten Molekülgewichten befinden. Anhand der nachfolgenden HSEs(siehe Ergebnisse HSE) und aufgrund der Kenntnis der Standards A und B, konnten wir die Lage der bekannten Substanzen in Abhängigkeit von ihrer Elution aus der Chromatographiesäule an der Kurve kennzeichnen.

3.4. Ergebnisse der HSE

3.4.1.

Versuchsdurchführung. Um bei der HSE sich überhaupt orientieren zu können, müssen bei jedem Lauf ein oder zwei verschiedene Standards mitlaufen. Diese haben einen bestimmten Aminosäure=gehalt und dienen zur Identifizierung gleicher Substanzen im unbe=kannten Material und als Markierungen, zwischen welchen die gesuchten Banden leichter gefunden werden können. Wir benutzten zwei Standards, die einen Gehalt an verschiedenen und gleichen Aminosäuren aufwiesen. Durch die Aminosäuren konnte man feststellen, ob sich die Substanzen gleich schnell über die Papierstreifen während des Laufes bewegt hatten. Diese wurden als Standard A und B bezeichnet. Ihre Auftrennung bei den von uns gebrauchten pH 1,9 und 3,6 ist in Abb. 10 und 11 zu sehen. Bei Prüfung der Standards zeigte sich, daß um eine gute Auftrennung zu bekommen, bei pH=1,9 der Auftragstrich auf dem Papier 20 cm. von der Anode entfernt sein muß; bei pH=3,6 muß der Strich ca. 30 cm. entfernt aufgetragen werden.

3.4.2.

Auswertung. Mit der gefriergetrockneten Substanz wurde eine 20%ige Aqua bidest.-Lösung hergestellt und eine HSE(HSE 23, siehe Abb. 19) durchgeführt. Der pH betrug dabei 3,6, die Spannung 6 KV, Stromstärke 50 mA und die Zeitdauer 6 Stunden. Fast das gesamte Gebiet A und dessen Banden wanderten über die Anode hinweg und waren deshalb nicht darstellbar. Im Abschnitt B waren 8 Banden zwischen Glutaminsäure und Asparaginsäure nach der Ninhydrinfärbung zu sehen. In der C-Gruppe, zwischen Glutamin=säure und der Auftragstelle, befanden sich zwei scharfe gut zu sehende Banden. Unter den B-Banden wurde folgende Bezeichnung der schärfer abgesetzten Banden vorgenommen: B_b,B_f,B_g; die schwächer angefärbten Banden wurden vorläufig folgendermaßen

gekennzeichnet: B_a,B_c,B_d,B_e,B_h.

3.4.3.

Isolierung der Peptide. Da weder durch die präparative trägerfreie Elektrophorese noch durch die Gelchromatographie eine völlige Isolierung der uns interessierenden Substanzen in der gesammelten Fraktion KH 78 ÜM 05#15-23 GS 10#I-XXII#20-30 erreicht werden konnte, wurden die Substanzen nach der vorher geschilderten Weise in der Hochspannungselektrophorese typisiert und dann folgendermaßen isoliert.

3.4.3.1.

Versuchsdurchführung. Bevor man die Isolierung der Banden vornehmen konnte, mußte festgestellt werden, welche Konzentration der Lösung die beste Trennung erlaubt. Wenn man eine Lösung zu dünn auftrug, so trennten sich zwar Banden vollkommen von einander, aber manche waren so schwach konzentriert, daß sie nicht anfärbbar waren; war die Lösung zu konzentriert, so waren die Banden gut anfärbbar, aber sie "schmierten" auf Grund der grossen Menge über die ganze Trennfläche. In HSE#24 wurden verschiedene Konzentrationen aufgetragen und getrennt. Es zeigte sich, daß ein gleichmäßiger Auftrag von 0,03 ml. über die gesamte Papierbreite von 30 cm. mit einer 20%igen Lösung des Materials die besten Ergebnisse lieferte. Dabei durfte sich der Strich nicht mehr als 2 cm. an den Längsrand des Papieres annähern, sonst bildeten sich dort dicke Schweife von Material, die nicht zu trennen waren. Es war besonders zu beachten, daß man das Material genau im rechten Winkel zum Längsrand des Papieres auftrug. Das Papier mußte auch vollkommen gerade zur Längsrichtung der Kühlkammer der Maschine gelegt werden, damit man später beim Herausschneiden der ungefärbten Streifen anhand des ninhydringefärbten Streifchens(siehe unten) möglichst homogene Bänder erhielt.

Wegen der grossen Menge der zu trennenden Substanz wurden 31 HE gebraucht, um die Trennung zunächst in drei große Gruppen (B_b, B_{c-g}, C_a und C_d) zu erlauben. Einzelne Banden konnten bei der ersten HE nicht erhalten werden. Zur weiteren Auftrennung wurden diese aus dem Papier eluiert. Von dem ungefärbten Pherogramm wurden die Randstreifen mit den Standards und ein dünnes Streifchen mitten durch das Material in Längsrichtung herausgeschnitten und gefärbt. So konnten die gesuchten Banden herausgeschnitten werden. Die Elution wurde ähnlich der Methode von Consden et al [14] durchgeführt. Dabei wurde aus den isolierten Banden spitzzulaufende Streifchen geschnitten. In eine Wanne mit bidest. Wasser wurde ein Filterpapier, dessen einer Rand zu mehreren Spitzen zugeschnitten war, so eingelegt, daß dieser Rand frei aus der Wanne ragte. An den Spitzen des Randes wurden die Papierstreifchen durch die Saugkraft des feuchten Papierbogens so angebracht, daß die Basis der Wanne zugekehrt war und die Spitzen über ein Auffanggefäß hingen. So kam es durch die kapillaren Kräfte des Wasssers und der Heberwirkung zu einer gleichmäßigen Durchspülung der Streifen mit Wasser, so daß sich das zu eluiernde Material an der Spitze sammelte und dann in die Auffanggefäße abtropfte. Um zu wissen, wann die Elution abgeschlossen war, d.h. die Streifchen frei von Material waren, wurden nach 15,30 und 45 Minuten Streifchen mit Ninhydrinreagens gefärbt und getrocknet. Es zeigte sich, daß bei allen Gruppen nach 30 Minuten sämtliche ninhydrinpositive Substanzen aus den Streifchen ausgewaschen waren. Da durch die Elution auch Papierpartikel ausgewaschen wurden, wurden die Fraktionen bei 5,000 U/min. zentrifugiert. Das Eluat wurde gesammelt, im Rotationsverdampfer eingeengt und gefriergetrocknet. Dabei konnten folgende Mengen gewonnen werden:

B_b: 0,105 g.

B_{c-g}: 0,811 g.

C_{a+d}: 0,54 g.

Aus praktischen Gründen wurden zunächst nur die Banden B_b, C_a und C_d bearbeitet. Erst nach 5-maliger Wiederholung der HSEs wurden diese 3 Banden bei pH=3,6 rein erhalten.

Das so erhaltene Material wurde dann einer weiteren Reinheitsprüfung bei pH=1,9 unterworfen. Zuerst wurde eine qualitative HSE gemacht, in der wir B_b gegen Glutathion oxidiert und Glutathion reduziert und Standards A und B laufen ließen (HSE#79). Glut. ox. und -red. wurden deshalb aufgetragen weil wir zuerst vermuteten, daß es sich bei B_b um Glutathion handeln könne, da es bei pH=3,6 immer sehr nah bei der Asparaginsäure lief und eine sehr stark anfärbbare Bande ergab, die auch für Glutathion charakteristisch ist. Anhand der HSE kann man eindeutig sagen, daß es sich bei B_b um ein eigenes Peptid handelt. B_b liegt nämlich als dunkelviolett anfärbare Bande zwischen Glut. red. (anodennäher) und Glut. ox. (kathodennäher). In Bezug auf die Standards liegen alle drei Banden anodisch von Tryptophan (siehe Abb. 20).
Es zeigte sich auch, das B_b noch stark verunreinigt war durch Valin, Glycin, Cystin und Taurin. In den nachfolgenden durchgef ührten HSEs bei pH=1,9 (HSE 31 bis 83) wurde B_b immer wieder von den anderen Aminosäuren getrennt und isoliert. In HSE#85 konnte die Reinheit des isolierten B_b endgültig nachgewiesen werden. Die Reinheit wurde nach der Isolierung bei pH=1,9, nochmals bei pH=3,6 (HSE#86) wiederholt. Diese doppelte Reinheitskontrolle bei zwei verschiedenen pH-Werten wurde bei allen anderen isolierten Peptiden auch gemacht.

Das gleiche Verfahren wurde dann bei der Isolierung von C_a und C_d angewandt. Hierbei benutzte man neben den Standards, als

Bezugssubstanz eine 10%ige Lösung von UM 05 GS 10#20-30, welches man bei den HSEs mitlaufen liess. Dabei stellte sich C_d als eine hellblaue, anfärbbare Bande dar, die zwischen Glutaminsäure und Methionin lag(Abb. 20). C_a war verunreinigt und war anscheinend bei dem Isolierungsversuch verlorengegangen.

Die aus der Elution gewonnen Lösungen C_d und B_b wurden dann unter einem Druck von 3 atü durch einen XM-50 Filter ultrafiltriert, um etwaige gröbere Verunreinigungen, die z.B. durch die Elution noch zugeführt wurden, zu entfernen.

Die gewonnen Peptide B_b und C_d wurden gefriergetrocknet und dann mit einem ml. Aqua dest. aufgelöst. Die Lösungen wurden dann in zwei aufgesägte(sterile) Ampullen mit Pasteurpipetten transportiert, im Exsiccator über Blaugel getrocknet und gewogen. Dabei ergaben die isolierten Mengen, Gewichte von:

C_d= 0,002909 g= 2,90 mg

B_b= 0,004870 g= 4,87 mg

Die Ampullen wurden nach dem Wiegen mit N_2-Gas von der Raumluft(über eine dünne Mikropipette, die an einer N_2-Gasschlauchzufuhr angeschlossen war) befreit, und zugeschmolzen. Die verschlossenen Ampullen wurden dann bis zur qualitativen und quantitativen Analyse im Kühlschrank bei -20° C. aufbewahrt.

3.4.3.2.

Versuchsauswertung. Der Grund, weshalb es mehrere HSEs bedurfte, um B_b endlich rein zu gewinnen könnte folgender sein. Erstens war das Peptid B_b deshalb nicht ganz rein, weil die Aminosäuren, wie Valin und Sarkosin, z.B. durch H-Brücken an das Peptid gekoppelt waren und bei jeder HSE nur wenig von diesen Aminosäuren freigesetzt wurden. Diese H-Brücken wurden bei dem starken pH des Puffers von 1,9 noch begünstigt. Dazu kommt noch, daß B_b sehr stark nach den vorange=

gangenen Isolierungen konzentriert war und deshalb an der Auftrags= stelle am Papier eine sehr große Konzentration vorlag.[13] Front - und Rückseite der wandernden Zonen trennten sich vollständig auf, bevor sich der mittlere Teil der aufgetragenen Lösung auftrennen konnte, und das darin enthaltene B_b und anderen Aminosäuren verteilten sich auf eine größere Fläche und die Grenzen verwischten sich dadurch. Das gleiche Problem trat bei den Auftrennungen und dem Versuch der Reindarstellung der anderen Banden in den nachfolgenden HSEs auf, da eine genaue Konzentrationsbestimmung des zu isolierenden Substanzgemisches aus rein technischen Gründen nicht möglich war.

3.5. Ergebnisse der präparativen Elektrophorese auf Papier

3.5.1.

Versuchsdurchführung. Da das aus der Gelchromatographie gewonnene Material KH 78 UM 05#15-23 GS 10#20-30 bei den Isolationsversuchen mit der HSE vollständig aufgebraucht war, wurden die Fraktionen GS 10#30-60 herangezogen, die auch noch einen Teil der gesuchten Komponenten enthielten. Um schneller zum Ziel zu kommen, wurde eine Auftrennung durch präparative, kontinuierliche Elektrophorese auf Papier(Elphor V_a) vorgenommen.

Wir benutzten bei der Auftrennung einen Puffer folgender Zusammensetzung:

Eisessig: 200 ml.

Pyridin: 60 ml.(pH=3,9)

H_2O ad 10 l.

Das Stromaggregat(#10 Abb. 7) lieferte eine Spannung von 300 V. und 30 mA. Das benutzte Elektrophoresepapier: Schleicher und Schüller Nr. 2040a, 475 x 550 mm.

Die Auftrennung des Standardgemisches A und B ist in Abb. 21 dargestellt. Die Ergebnisse der Auftrennung des Materials KH 78 UM 05#15-23 GS 10#30-60 ist in Abb. 22 schematisch dargestellt. Dabei wurden 70 ml. einer 10%igen Lösung für den Versuch verwendet. Das aufgetrennte Puffersubstanzgemisch wurde aufgefangen und gesammelt. Am Schluß wurde es dann mit dem Rotationsverdampfer konzentriert.

Nach Beendigung der Auftrennung ergab die Färbung die 5 dargestellten Banden in Abb. 22. Die Fraktionen in denen die Komponenten des B- und C- Bereiches zu erwarten waren wurden konzentriert und mit der HSE bei pH=3,6 untersucht(für 7 Stunden bei einer Spannung von 6KV und 50 mA). Dabei fanden sich nach der Ninhydrinfärbung folgende Banden aufgetrennt(siehe auch Abb. 24):

Tab. 4. Ergebnisseder HSEs nach Auftrennung mit Elphor-V_a.

Fraktionnummer:	darstellbare Banden:
22-23	C_a und C_d und B-Banden und Neutrale(unscharf da sehr konzentriert)
25-26	nur C_a und sehr unscharfe unbekannte Banden(ölige Substanzen, vielleicht Grund für Behinderung der Gefriertrocknung)
20	sehr deutlich C_a und C_b und starke B-Banden und Neutrale
21	C_a, B-Banden und Neutrale

Da HSE 97(Fraktionsnummer 20) eine leicht anfärbbare Bande zwischen B_b und Asparaginsäure zeigte, untersuchten wir das Papier unter dem UV-Licht. Dabei sahen wir neben der gerade beschriebenen Bande zwei gelblich leuchtende Banden, die mit Ninhydrin sich nicht anfärbten. Diese Banden lagen zwischen C_a und C_d im neutralen Bereich. Am besten waren diese Banden im getrockneten ungefärbten Zustand(HSE 98) zu sehen(siehe Abb. 25).

Die HSEs zeigten außerdem, daß die Va die vollkommene Entfernung der basischen Peptide und Aminosäuren erlaubte und der neutrale Anteil der Substanzgemische in den Küvetten der Va nur sehr gering war. Dadurch wurden viele Auftrennungsschritte, die bei der alleinigen Verwendung der HSE nötig geworden wären, über= sprungen.

Es wurden dann die Banden C_a und C_d und die B-Banden aus dem Papier getrennt und eluiert. In HSE 91 bis 112 wurden die C- und B-Banden elektrophoretisch bei pH=3,6 aufgetrennt. Es zeigte sich, daß in den gewonnenen Substanzgemischen sehr klare Banden von B_d, B_f, B_g und C_a vorhanden und diese gut zu trennen waren. Nach einem eindeutigen Reinheitsnachweis bei pH=3,6 (HSE 108 und HSE 111) wurde die Reinheitsprüfung bei pH=1,9 vorgenommen(HSE 113, Abb. 20). Dabei zeigten sich C_a und B_g bei diesem pH als rein, B_d und B_f dagegen nicht. B_d enthielt noch Anteile von Valin und Glutaminsäure und B_f Spuren von Tyrosin, Tryptophan und B_d. In HSE 114 wurden die Banden eindeutig heraus= getrennt(Reinheitsnachweis HSE 115).

Die so gewonnenen Fraktionen wurden dann genauso behandelt wie vorher die Banden C_d und B_b. Nach der Trocknung und Einschmelzung in Ampullen, wurden beim Wiegen folgende Ertragsmengen festgestellt:

C_d= 0,004008 g= 4,008 mg.
B_d= 0,005476 g= 5,476 mg.
B_f= 0,019740 g= 1,974 mg.
B_g= 0,001750 g= 1,750 mg.

3.5.2.

Auswertung. Es wurde schließlich noch der Versuch unternommen eine möglichst vollständige Übersicht der Komponenten des B- und C-Bereiches zu erstellen. Im Vollextrakt ist das wegen deren im Verhältnis zu den Aminosäuren sehr niedrigen Konzentration nicht möglich. Bei der Auftrennung im V_a-Elphor ergaben sich nach der Färbung vier Banden(Abb. 23). Es wurde daher mittels V_a-Elektrophorese eine Gruppentrennung eines Gesamtextraktes vorgenommen(Nowy) und daraus 2 Gruppen entnommen, in denen die bisher beobachteten B- und C-Komponenten vorhanden waren. Man

erreichte damit eine Grundlage für die Bezeichnung der einzelnen positiven Banden(Abb. 25.) und einen Vergleichsstandard für die isolierten Komponenten. Neben den ninhydrinpositiven Banden wurde im C-Bereich noch eine im langwelligen UV-Licht fluoreszierende Bande zwischen C_a und C_d beobachtet. In der Fraktion 22-24 stellte sich außerdem eine Bande zwischen der fluoreszierenden und C_a nach Anfärbung dar(C_c in Abb. 25). Eine genaue Darstellung einzelner Banden war sehr schwierig und erforderte eine große Anzahl von Hochspannungselektrophoresen, um eine scharfe Auftrennung zu bekommen und das noch bei einem sehr geringen Rest von Material. Es gelang aber trotzdem endlich eine sehr scharfe Auftrennung und damit exakte Darstellung aller Banden, zu machen(siehe Abb. 25). Die Benennung mit grossen Buchstaben B und C wurde von Nowy übernommen und bedeutet die Position zwischen Asparaginsäure und Glutaminsäure(B-Banden-Bereich) bzw. Auftragstelle und Glutaminsäure(C-Banden-Bereich) bei Auftrennung bei pH=3,6. Die kleinen Buchstaben wurden zur genaueren Bestimmung der einzelnen Banden benutzt. Nach dieser Benennung war es möglich sämtliche schon isolierten Banden zu bezeichnen und die vorhergegangenen HSEs damit zu kennzeichnen. Zur Dokumentation wurden alle wichtigen HSEs mit einer Kleinbildkamera(mit Stativ bei langer Belichtung-39 msek. und einen 15-din Film) fotographiert.

Zur endgültigen Überprüfung der Reinheit der gewonnenen Banden und zur sicheren Bestimmung wurde eine letzte HSE gemacht (HSE 125, siehe Abb. 25). Hier wurden alle isolierten Banden, schon vorher erwähnt, mit der von Nowy hergestellten B/C Standard verglichen. Das Resultat war, daß alle Banden rein waren, außer zwei.

Die eine Bande, von uns als B_h bezeichnet(siehe Abb. 19), zeigte eine sehr schwache Verunreinigung mit einem neutralen Anteil(s. Abb. 25). B_h zeigte sich nach der Kristallisation(s. dort) im Mikroskop ebenfalls verunreinigt und wurde deshalb den weiteren Versuchen nicht zugeführt.

Die andere Bande, von uns als B_f bezeichnet, zeigte die gleiche Auftrennung in dieser letzten HSE wie B_h. Bei dieser Auftrennung nahm B_f die gleiche Lage ein und zeigte nach Ninhydrinfärbung dieselbe violette Färbung wie B_h. In früheren HSEs stellte sich B_f immer als rötliche Bande nach der Ninhydrinfärbung dar(s. Abb. 19). Es muß sich daher bei dieser lezten HSE zur Identifizierung der Banden um eine Verwechselung des Materials von B_f und B_h bei der Auftragung handeln. Dabei wurde statt B_f,B_h zweimal aufgetragen. Das isolierte Material B_f befand sich/ja bei dieser HSE als rötliche Referenzbande im aufgetragenem Peptidgemisch(Nowy Va 22-24, Abb. 25), konnte nicht mehr gefunden werden und war anscheinend verlorengegangen.

3.6. Hydrolyse Ergebnisse

Um zu sehen ob die vorher beschriebene Methode der Hydrolyse funktioniert,wurde ein Probelauf mit dem Tripeptid Glutathion oxidiert unternommen(HSE 115). Die HSE zeigte, daß sich das Glutathion ox. vollständig in die 3 Aminosäuren Cystin, Glutaminsäure und Glycin auftrennte. Es blieb kein Rest eines nicht aufgetrennten Peptids übrig. Mit diesem Ergebnis konnten wir die Hydrolyse der isolierten Peptide vornehmen.

Um eine ganz genaue Identifizierung der Banden vornehmen zu können, liesen wir die hydrolysierten Peptide nicht nur gegen die Standards A und B laufen, sondern auch gegen die Aminosäuren Valin, Histidin, Alpha-Aminobuttersäure, Sarkosin, Serin, Alanin sowie Glutathion oxid. hydrolysiert(HSE 117-121 und 125). Die Resultate sind in Abb. 26 zu sehen. Diese HSEs liefen verschieden lange Zeiten(1.5,2 und 3 Stunden), um den ganzen Bereich genau überprüfen zu können.

Da, wie schon erwähnt, bei der sauren Hydrolyse Tryptophan gänzlich außerdem Tyrosin, Asparaginsäure, Prolin, Lysin und die schwefelhaltigen Aminosäuren sowie die Oxysäuren zu verschiedenen Prozentteilen zersetzt werden, läßt sich über das eventuelle Vor= kommen dieser Aminosäuren im Hydrolysat keine sichere Angaben machen. Wenn man die Intensität der Färbung mit der Ninhydrinlösung mit Anzahl Kreuze zum Ausdruck bringt, haben sich bei den einzelnen HSEs die getrennten Aminosäuren der Hydrolysate folgendermaßen stark gefärbt:

B_b-	+ + Cysteinsäure	+ + + Glycin
	+ + Glutaminsäure	+ + + Äthanolamin (=Colamin)
	+ + Alanin	
	+ + Serin	

B_d-

+ + + Glutaminsäure

+ + Glycin

+ Serin

+ + + Colamin

B_g-

+ Glutaminsäure

+ + Threonin

+ + + Serin

+ + Glycin

C_a-

+ Glutaminsäure

+ + + Serin

+ + Alanin

+ + + Glycin

C_d-

+ + + Glutaminsäure

+ + Serin

+ + + Glycin

3.7. Kristallisation

3.7.1.
Theorie. Vor den Möglichkeiten der modernen biochemischen Technik war außer wenigen anderen physikalisch-chemischen Methoden die Kristallisation und anschließende Betrachtung im Mikroskop oder Polarimeter ein wichtiger Untersuchungsteil einer jeden biochemischen Untersuchung von isolierten Aminosäuren und Peptiden.

Da die Methode der Kristallisation sehr einfach durchzuführen und nicht aufwendig ist, verwendeten wir sie in unserer Aufschlüsselung der isolierten Peptide. Diese Methode erlaubt außerdem sich ein Urteil über die Reinheit der Peptide zu bilden.

3.7.2.
Versuchsdurchführung. Die trockenen nicht-hydrolysierten, reinen Präparate wurden einzeln mit 5 Tropfen Aqua bidest. aus einer Mikropipette aufgelöst und mit einer Pasteurpipette auf Uhrgläschen übertragen. Diese wurden mit einem zweiten Uhrgläschen zugedeckt und mit Tesafilm an die andere Schale befestigt. Es wurde dabei ein kleiner Luftspalt gelassen, damit das Material ohne Bildung von Kondenswasser verdampfen konnte. Damit das Material nur langsam trocknete, wurden die Schalen in einen Kühlschrank(-4° C.) gestellt um größere Kristalle zu erhalten. Die Präparate brauchten 2 Tage bis zur völligen Trocknung. Die Schalen wurden dann einzeln unter dem Mikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen beobachtet.

3.7.3.
Auswertung. Siehe Abb. 27 und 28. (Vergleiche aus Lit. Verz.# 35)

Formen schematisch vereinfacht:

B_b- Das Material war ziemlich rein, außer kleinen Fuseln(Staub oder kleinste Papierreste vom Elutionsvorgang). Die Peptide zeigten sich als tafelige Kristalle mit sechseckiger Umgrenzung

(wie z.B. Bernsteinsäurekristalle). Diese Kristalle verteilten sich gleichmäßig über die Schale.

B_d- Das Material war vollkommen ohne Verunreinigung. Die Peptidkristalle zeigten sich als isometrische Kristalle mit würfeligem Habitus(wie z.B. NaCl-Kristalle).

B_g- Das Material war, außer ein Paar Fuseln, rein. Die Kristalle waren prismatisch mit schiefer Endbegrenzung(wie z.B. Na-thiosulfat).

B_h- Dieses Material, welches sich im HSE in zwei Banden auftrennte, zeigte im Mikroskop zwei verschiedene Kristallformen- prismatische Kristalle mit schiefer Endbegrenzung ähnlich B_d und skelettförmige Wachstumsformen(wie z.B. Ammonium=chloridkristalle). Anscheinend sind diese 2 Kristalle: die eine das Peptid $B_g(B_h)$ und die andere die Verunreinigung(ein neutrales Peptid oder eine Aminosäure).

C_d- Das Material war vollkommen rein und stellte sich als Kristallgruppe von Rosetten tafeliger Kris=tällchen(wie z.B. Na-Tartarat-Kristalle) dar. Es erschien wie ein Komplex aus vielen Einzel=kristallformen.

C_a- Obwohl zweimal versucht wurde das Material mit Aqua dest. gleichmäßig aufzulösen, war es un=möglich eine Kristallisation des Peptids im Mikroskop zu sehen. Man sah lediglich eine sehr regelmäige Zeichnung von Linien(siehe Abb. 28) die aber als Trocknungsercheinungen zu deuten sind.

3.8. Ergebnisse der Aminosäureanalyse

3.8.1.

Versuchsdurchführung. Es wurde jeweils 4µg von hydrolysiertem Peptid abgewogen und in Reagensgläser in einen Exsiccator für 24 Stunden gestellt, damit das Material möglichst trocken der Analyse zugeführt werden konnte. Zusätzlich wurden 4µg Colamin (Fa. Fluca)- für die Analyse vorbereitet.

Zuerst wurde ein Lauf mit den bekannten Standardaminosäuren gemacht(Abb. 29). Die photometrische Messung erfolgte bei zwei Wellenlängen(570 nm und 440 nm obere Linie), da Prolin(siehe Pfeil in Abb.29) bei der Reaktion mit Ninhydrin ein Produkt liefert, dessen Absorptionsmaximum bei 440 nm liegt.[17] Da auch Ammoniak mit Ninhydrin reagiert., wird es ebenfalls photometrisch erfaßt.

Als nächstes wurde eine Auftrennung des Standards Colamin (Äthanolamin) gemacht, da wir anhand der HSEs wußten, daß manche Peptide Colamin enthalten, dieses aber nicht bei den normalen Aminosäurensequenzstandards dabei war. Die Position des Colamins wurde in der Kurve bestimmt und ist ebenfalls in der Abb. 29, neben den aufgezeichneten Standards, schematisch festgehalten.

Durch Zugabe von Aqua dest. wurden die getrockneten Reinhydrolysate erneut in Lösung gebracht. Jede Probe wurde mit 75µl. aufgelöst und mit 0,6 ml. des standardisierten Auftragspuffers(Natriumcitratpuffer) gemischt. Davon wurden 0,5 ml. in den Analysator eingespritzt und über Schläuche der Maschine zugeführt. Anhand der automatisch aufgezeichneten Absorptionskurven und ihrer tabellarisch aufgezeichneten Integrale konnte man die Mengen an Aminosäuren prozentual bestimmen. Der Integralrechner schrieb für jede Aminosäureauftrennung eine Karte auf der folgende Daten aufgetragen wurden: 1. Reihenfolge der einzelnen Peaks=gemessenen

Extinktionen mittels Photometer.

2. Genaue Zeitangabe wann gemessene Aminosäuren aus dem Fraktionssammler den Photometer zugeführt wurde.
3. Quantitative Berechnung des Ausschlages.
4. Fläche des graphisch ermittelten Peaks.

Die Aufzeichnung ist in Abb. 30 und 31 zu sehen. Wie schon bei der Hydrolyse erwähnt worden ist, sind die Amide Asparagin und Glutamin nicht im Hydrolysat nachweisbar, da sie zu Aspartat bzw. Glutamat und Ammoniak abgebaut werden. Der NH_3-Peak, der nach Lysin erscheint könnte so erklärt werden(siehe Abb. 29). Außerdem erscheint kurz vor dem NH_3-Peak eine Peak in sämtlichen Kurven, der aber nur einen Artefakt darstellt. Sämtliche Versuche wurden bei pH= 3,22 und pH= 4,05 durchgeführt. Der Pufferwechsel wurde auch als Strich in der Kurve aufgezeichnet(siehe Abb.)

3.8.2.

Auswertung. Durch Vergleich der Kurven der isolierten Hydrolysat= lösungen mit den Standardgemischen und Colamin war es möglich, durch den Rechner angegebene Flächeninhalte bie 570 nm, folgende quantita= tive Ergebnisse der Aminosäurezusammensetzung der Peptide zu berechnen (Es wurden zwei Analysen gemacht, da bei der ersten Analyse eine Verschleppung von Colamin bei dem Probenauftrag passierte):

B_b-	19,7%	Colamin
	5,34%	Serin
	31,79%	Glutaminsäure
	36,79%	Glycin
	2,50%	Alanin
	1,29%	Cysteinsäure

An Verunreinigungen fanden sich:

0,85%	Asparagin
0,98%	Threonin

0,95% Lysin

0,60% Tyrosin

0,50% Isoleucin

0,30% Leucin

I - 10,01% Serin

25,56% Glutaminsäure

27,33% Glycin

14,24% Colamin

An Verunreinigungen fanden sich:

2,90% Lysin

4,50% Asparagin

2,95% Threonin

4,79% Alanin

5,62% Leucin

2,44% Isoleucin

B_g- 7,28% Threonin

28,30% Serin

14,84% Glutaminsäure

22,76% Glycin

10,50% Lysin(hatte sich bei der HSE der Hydrolysate von B_g nicht mit Ninhydrin anfärben lassen)

An Verunreinigungen fanden sich:

1,9% Leucin

1,9% Isoleucin

3,4% Asparagin

1,4% Alanin

C_a- 22,70% Serin

9,75% Glutaminsäure

19,89% Glycin

9,70% Alanin

6,40% Lysin(hatte sich bei der HSE der Hydrolysate von C_a nicht mit Ninhydrin anfärben lassen)

An Verunreinigungen fanden sich:

5,0% Asparagin(da diese Menge aus Asparaginsäure und dem Amin der Aminosäure besteht, gilt diese Menge als bloße Verunreinigung)

2,5% Histidin

2,2% Colamin

2,0% Leucin

2,0% Isoleucin

C_d- 34,0% Glycin

34,0% Glutaminsäure

11,0% Serin

An Verunreinigungen fanden sich:

3,9% Asparagin

3,4% Lysin

1,91% Colamin

1,25% Arginin

0,32% Histidin

2,7% Leucin

2,7% Isoleucin

2,1% Valin

2,1% Alanin

2,6% Threonin

Zu dem Ergebniss von B_b muß noch gesagt werden, daß durch die Aminosäureanalyse der Gehalt an Colamin im Hydrolysat nachgewiesen werden konnte. Hydrolysate C_a und B_g ergaben nach der Ionenaustrausch=chromatographie einen Lysingehalt von über 4% ohne daß diese Aminosäurebande des gleichen Hydrolysates sich mit Ninhydrinlösung anfärbte. Dies kann man damit erklären, daß der geringe Gehalt an Lyssin (6,4% in C_a und 10,59% in B_g) nicht die Nachweisgrenze des Ninhydrin=reagens erreicht hatte. Nach Clotten[13] hat Lysin, neben Hydroxyprolin und Tyrosin die höchste Nachweisgrenze in µg. von allen Aminosäuren die nach der Hse mit Ninhydrinreagens

gefärbt werden. Um z.B. die gleiche Farbintensität nach Ninhydrin=färbung von Lysin und Glutaminsäure zu erreichen, müssen im Elektrophoresepapier sich die fünffache Mengen an Lysin im Verhältnis zu Glutaminsäure befinden. Im Verhältnis zu Serin wäre fast die achtfache Menge an Lysin nötig- diese Tatsache würde auch erklären weshalb Serin, wenn auch sehr schwach, ninhydrinpositiv durch HSE nachweisbar war, obwohl relativ geringe Prozentanteil in den Peptiden B_b und B_d mit der Ionenaustauschchromatographie festzu=stellen waren.

4. DISKUSSION.

Die von uns benutzten Verfahren der Isolierung, deren Anwendung bei jeder biochemischen Methode ausführlich begründet wurde, erlauben die Reindarstelung von Peptiden. Die gleichen Verfahren wurden mit Erfolg von der Gruppe um Nowy(Donhäuser, Bubl, Enzler,Haiß und Schmück) in der Isolierung niedermolekularer Peptide angewandt.

Wie schon in der Einführung erwähnt, ist die Anzahl von Arbeiten über den Peptidgehalt des Herzens sehr gering. Die meisten biochemischen Arbeiten über das Myokard befassen sich mit dem Kontraktionsmodell des Herzmuskels(d.h. die Strukturaufklärung von Aktin, Myosin und für den Kontraktionsablauf wichtige Enzymen oder über Indikatorenzymen bei Herzinfarkt(z.B. CPK, LDH und HBDH). Da diese Stoffe alle hochmolekulare Proteine oder Polypeptide darstellen, ist es nicht möglich, einen Vergleich der Ergebnisse unserer Untersuchungen mit denen anderer anzustellen. Andere Untersuchungen, die sich mit den freien Aminosäuren im Herzgewebe befassen, behandeln die von uns untersuchten Peptide nur als Nebenergebnisse. Kothny [33], z.B. untersuchte den normalen Kalbs=herzmuskel mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese nur auf seinen Gehalt an freien Aminosäuren hin und verglich seine Ergebnisse mit dem Gehalt an freien Aminosäuren im Rattenherz, welches von Tjutcev [45] ebenfalls mit der HSE untersucht wurde. Biserte und Boulanger [7] konnten im Herzen von Rindern folgende Aminosäuren nach Hydrolyse in signifikanter Menge nachweisen: 12% Beta-alanin, 16% Asparaginsäure, 77,7% Glutaminsäure, 25,9% Glycin, 6,9% Threonin(unter 5% werden bei der Zusammenstellung nicht beachtet). Diese Arbeiten waren aber nur immer Untersuchungen am Gesamtextrakt und können deshalb mit unseren Ergebnissen nicht verglichen werden.

Schmück [42] konnte ein Peptid isolieren(von ihm Peptid A genannt) welches im Bereich der neutralen Aminosäuren bei pH=1,9 zwischen

Colaminphosphat und Glutathion lag und aus folgenden Aminosäuren bestand(Typisierung mittels Dünnschichtchromatographie und HSE): Taurin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin, Alanin, Glycin,Serin oder Valin. Dieses Peptid befand sich damit in dem von uns benannten D-Bereich(siehe Ergebnisse HSE). Haiß[23] untersuchte das gleiche Peptid. Die Ionenaustauschchromatographie dieser Substanz ergab jedoch andere Ergebnisse als bei Schmück. Er stellte fest, daß sein"Peptid A" aus Colaminphosphat, evt. Colamin und aus einem dritten Bestandteil, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt von Colaminphosphat handelt, bestand. Er begründet sein unterschiedliches Ergebnis mit der Erklärung, daß die Konzentrationen der ermittelten Aminosäuren bei Schmück zu gering waren und sie deshalb Verunreinigungen waren. Am interessantesten sind aber die Versuchsergebnisse von Bubl[10] und Enzler[19], die Peptide angeblich isolierten, welche sich in dem von uns untersuchten Bandenbereichen befanden.

Bubl isolierte sein "Peptid G" mit Hilfe von Hochspannungselektrophorese und Gelchromatographie. Es handelte sich dabei um eine hydrolysierbare und ninhydrinpositive Substanz zwischen Glutaminsäure und $Glutathion_{red}$ und wurde schon von Donhauser[16] in seiner Arbeit bei der elektrophoretischen Auftrennung von Kalbsherzextrakt mit dem Puffer pH=3,9 beschrieben. Nach der sauren Hydrolyse konnte er den größten Anteil der Aminosäuren mittels der HSE folgendermaßen bestimmen: Glutaminsäure, Alanin, Glycin und Cysteinsäure. Diese Aminosäuren wurden von uns auch bei der HSE und Aminosäureanalyse von B_b gefunden. Die Lage des Peptids in der HSE ist ebenfalls die gleiche wie die des Peptids von Bubl, nämlich zwischen $Glutathion_{red}$ und Glutaminsäure. Zusätzlich aber zu den oben beschriebenen Aminosäuren, fanden wir Serin und Colamin in signifikanten Mengen. Dieses Ergebnis muß deshalb auch richtig sein aus zwei Gründen: Erstens erlaubte die Ionen=

austauschchromatographie die sichere Identifizierung der Amino= säuren Serin im Hydrolysat. Diese konnte Bubl wahrscheinlich nicht mit der HSE alleine nachweisen, da sie in einer relativ geringen Konzentration vorkommt(nur 14,29%). Die Glutaminsäure konnte er aber trotdem nachweisen. Zweitens, konnte Bubl den Gehalt an Colamin nicht nachweisen, weil er die genaue Identifizierung der Standard= aminosäuren nicht wusste, beziehungsweise sich in ihrer Lage im Pherogramm irrte(er hatte z.B. in einer Abbildungen seiner Doktor= arbeit die Lage des Colaminphosphats falsch aufgezeichnet.)

Enzler[19] isolierte ebenfalls ein niedermolekulares Peptid aus dem Kalbsmyokard und machte eine Identifizierung der Aminosäure= zusammensetzung mit der Hochspannungselektrophorese und der Dünn= schichtchromatographie. Er nannte sein Peptid, "Peptid H" und nach seinen Aufzeichnungen lag es bei pH 3,6 zwischen der Auftragstelle und Glutaminsäure. Als Aminosäurezusammensetzung gab er an: Arginin, Glycin, Serin, Glutaminsäure, Leucin und Phenyl= alanin. Ein genauer Vergleich zwischen diesem Peptid und den von uns isolierten C-Peptiden ist leider nicht möglich, obwohl das in diesem Bereich isolierten(C_a und C_d), wir aber vier C-Banden feststellten. Da die zwei von uns untersuchten C-Peptide nicht in die Aminosäurezusammensetzung mit dem "Peptid H" von Enzler über= einstimmen, ist es möglich, daß Enzler das Peptid C_c oder C_b isolierte.

An allen der vorgenannten Doktorarbeiten, außer bei Haiß, muss kritisiert werden, daß quantitative Aminosäureanalysen fehlten. Obwohl die Ergebnisse der HSE eine gute Übersicht von enthaltenen Aminosäuren im Hydrolysat der einzelnen gewonnenen Peptiden erlaubte, war eine sichere Bestimmung eventuell in geringerer Menge enthaltener Aminosäuren nicht wie mit der Ionenaustausch=

chromatographie möglich. Es muss auch gesagt werden, daß wir durch unsere Methoden größere Peptidmengen gewinnen konnten. Unsere eigenen Untersuchungen müßten durch Sequenzanalysen ergänzt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Die von uns isolierten Peptide aus dem Kalbsherzen würden sich einer eventuellen pharmakologischen Untersuchung anbieten. Wie in der Einleitung schon erwähnt, haben manche Untersuchungen die Kreislaufwirkung hormonähnlicher Substanzen aus dem Herzen, wie z.B. das "myocardial-depressant factor" von Glenn [22], beschrieben. Hickling et al [28] konnten ein Polypeptid aus dem Rattenherz isolieren, welches die Aktivität von Natriumionen am Myokard unterdrückt. Das Polypeptid hatte ein MG von 700 und bestand aus folgenden Aminosäuren: Alanin, Glycin, Asparagin, Glutamin und Lysin. Die Untersuchung der eventuellen biologischen Wirkung der von uns isolierten Peptiden würde vielleicht Wirkungen and der Zellmembran des Myokards entdecken, welche die Herzfunktion beeinflussen.

Ein anderer interessanter Gesichtspunkt, der sich durch unsere Untersuchung ergibt, wäre anhand unserer Pherogramme ein Vergleich mit Pherogrammen pathologisch veränderter Herzen. Es wäre vielleicht dabei möglich, Veräanderungen in den niedermolekularen, ninhydrinpositiven Substanzen festzustellen und diese mit pathologischen Vorgängen im krankem Myokard in Zusammenhang zu bringen. Damit wäre eine ganz neue und interessante Möglichkeit der vergleichenden Diagnostik zwischen normalem und krankem Myokard ausgearbeitet, und man könnte, z.B. durch Biopsie von Myokard aus dem lebenden herzkranken Patienten eine genaue Diagnose seines Herzleidens stellen. Chronische Veränderungen im Herzmuskel, wie z.B. bei Kardiomyopathien, Herzinsuffizienz oder Koronarinsuffizienz könnten durch Ermittlung des Gehalts and Peptiden im Gewebe(z.B. aus den von uns isolierten Bandenbereichen) vielleicht zeigen, daß durch die allgemeine chronische Mangelversorgung des Herzmuskels eine herabgesetzte Stoffwechselleistung der Myokardzelle in

eine erniedrigte Produktion dieser Peptide sich äußern würde. Auch könnten akute Muskelzelluntergänge, wie z.B. beim Herzinfarkt mit nachfolgender Muskelnekrose zu Anhäufung dieser Peptide kommen- durch das Sistieren von energieverbrauchende proteolytischen Vorgängen im toten Bezirk verursacht- und diese freigewordene Stoffe über den Kreislauf als Transmitterhormone beim kardiogenen Schock eine Rolle spielen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Absicht dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung einer Reihe von niedermolekularen Substanzen aus Kalbsherzmuskeln von denen angenommen wurde, daß es sich um niedere Peptide handelt.

Als Ausgangsmaterial dienten ca. 5 Kilogramm frische Kalbsherzen. Aus dem wässrigen Extrakt wurde durch Ultrazentrifugation ein Stoffgemisch mit Molekulargewichtsbereich unter ca. 500 hergestellt. Das gefriergetrocknete Material hatte ein Gewicht von 64 Gramm. Mit Hilfe der präparativen Elektrophorese wurde eine Gruppe von ninhydrinpositiven Substanzen angereichert von denen nach ihrem Verhalten in der Hochspannungselektrophorese anzunehmen war, daß es sich um saure Peptide handelt. In der Hochspannungselektrophorese fanden sich diese Substanzen bei einem pH von 3,6 im Bereich zwischen Auftragstelle und Glutaminsäure(C-Gruppe) bzw. zwischen Glutaminsäure und Asparaginsäure (B-Gruppe). Daß es sich dabei um hydrolysierbare Substanzen handelt, war schon aus früheren Untersuchungen bekannt. Nach wiederholter hochspannungselektrophoretischer Auftrennung konnte schließlich aus einer größeren Zahl fünf Substanzen durch Elution erhalten werden, die genauer untersucht wurden. Die Gewichtsmengen dieser Substanzen waren: B_b und B_d ca. 5 mg., C_a ca. 4 mg., C_d ca. 3 mg., B_g ca. 2 mg. Als Reinheitskriterium wurde die Einheitlichkeit der Banden bei zwei verschiedenen pH-Werten gewählt(pH= 3,6 und pH= 1,9). Die erhaltenen Substanzen wurden kristallisiert und mit 6-N. HCl hydrolisiert. Die Hydrolysate wurden hinsichtlich ihres Aminosäuregehaltes zunächst hochspannungselektrophoretisch untersucht und dann noch im Aminosäureanalysator(Ionenaustauschchromatographie) aufgeschlüsselt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

B-Bereich: 1.) B_b: Glycin, Glutaminsäure, Serin, Alanin, Cysteinsäure
(ungefähres Mengenverhältnis= 29:25:4:2:1)

2.) B_d: Glycin, Glutaminsäure, Colamin, Serin(2:2:1:1)

3.) B_g: Serin, Glycin, Glutaminsäure, Lysin, Threonin (4:3:2:1,5:1)

C-Bereich: 4.) C_a: Serin, Glycin, Glutaminsäure, Alanin, Lysin (3,5:3:1,5:1,5:1)

5.) C_d: Glycin, Glutaminsäure, Serin(3:3:1)

Die Ergebnisse der Hochspannungselektrophorese und der Ionenaustauschchromatographie stimmten weitgehend überein, lediglich Lysin, das in Peptid B_b und C_a in der Ionenaustauschchromatographie in geringen Mengen nachweisbar war, sich aber in der Hochspannungselektrophorese nicht mit Ninhydrin darstellen ließ. Eine Aminosäuresequenzanalyse war aus technischen Gründen nicht möglich.

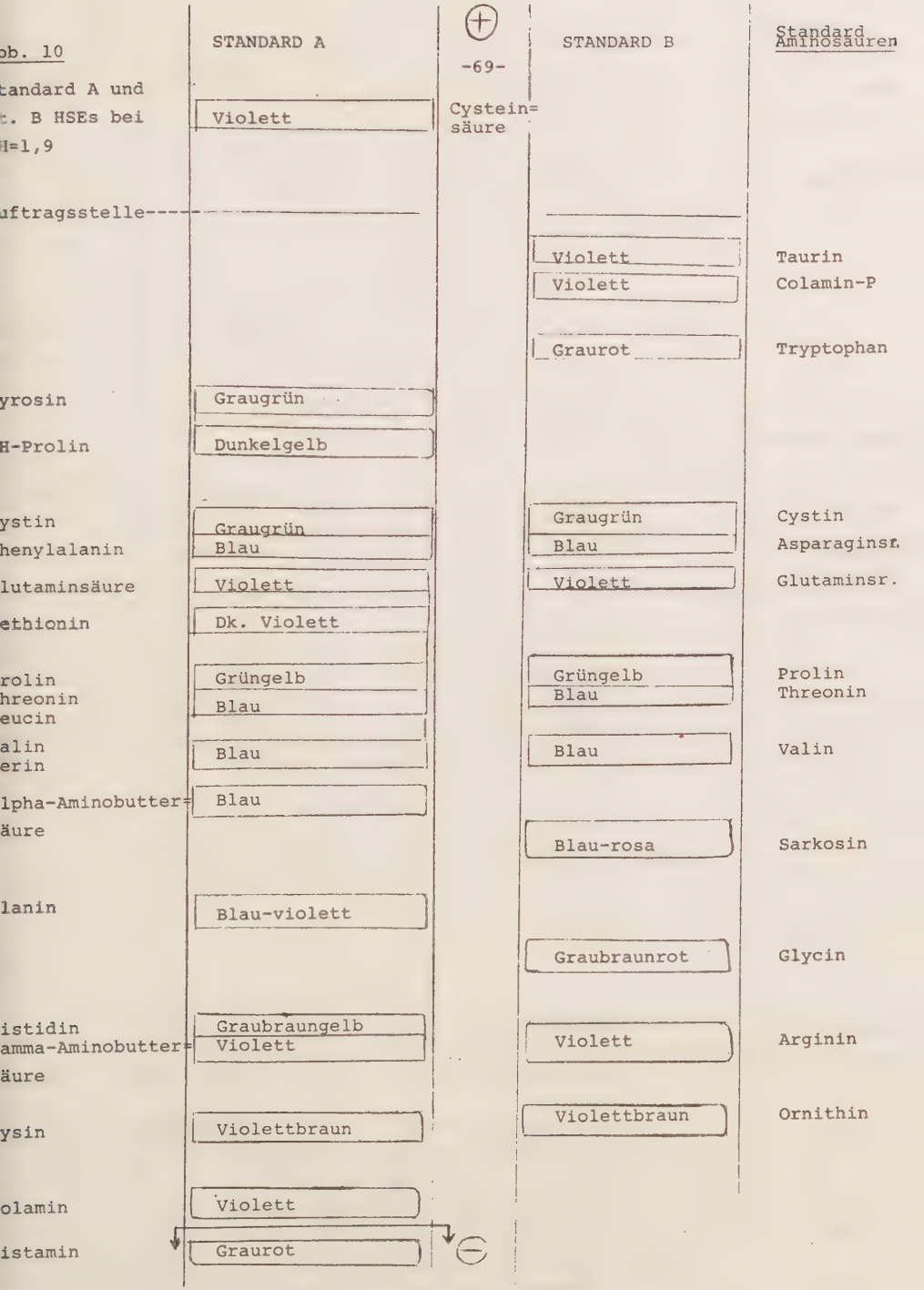
Neben diesen isolierten Substanzen wurden nach Auftrennung in der Hochspannungselektrophorese noch weitere Banden gefunden. Diese wurden mit B_a,B_c,B_e,B_f und C_c bezeichnet. Neben diesen ninhydrinpositiven Banden ist im C-Bereich noch eine im langwelligen UV-Licht fluoreszierende Bande gefunden worden, die ihrer Lage nach mit C_b bezeichnet wurde. Von den letztgenannten Substanzen wurde eine Analyse des Aminosäuregehaltes nicht durchgeführt.

ABBILDUNGEN NUMMER 10-31

Erklärung: Bei den folgenden Abbildungen wurden untenstehende Abkürzungen benutzt:

a+ABS= alpha-Aminobuttersäure
Ala= Alanin
Asp= Asparaginsäure
Arg= Arginin
Art= Artefakt
Col= Colamin
Col-p= Colamin-Phosphat(organisches Phosphat)
Cys.= Cystin
Cyst.= Cysteinsäure
g-ABS= gamma-Aminobuttersäure
Glu= Glutaminsäure
Gly= Glycin
His.= Histidin
Hist.= Histamin
Isoleu.= Isoleucin
Leu= Leucin
Lys= Lysin
Meth= Methionin
OH-Pro= Hydroxyprolin
Orn= Ornithin
Phe= Phenylalanin
Pro= Prolin
PW= Probenwechsel
Sark= Sarkosin
Ser= Serin
Stnd= Standard
Tau= Taurin
Try= Tryptophan
Tyr= Tyrosin

HSE= Hochspannungselektrophorese
Va= Präparative, trägerfreie Elektrophorese



bb. 10

tandard A und
t. B HSEs bei
H=1,9

uftragsstelle

yrosin

H-Prolin

ystin
henylalanin

lutaminsäure

ethionin

rolin
hreonin
eucin

alin
erin

lpha-Aminobutter-
äure

lanin

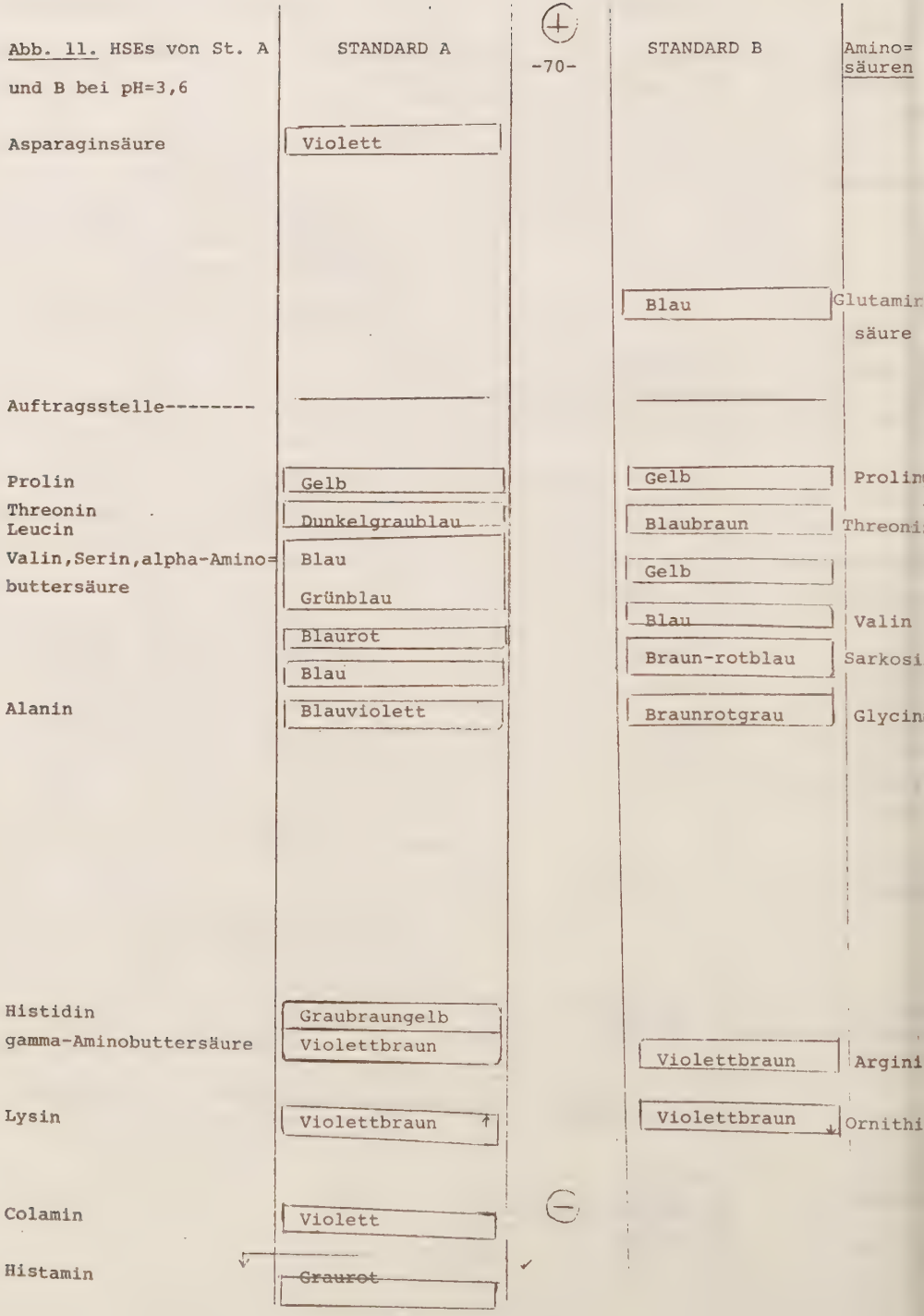
istidin
amma-Aminobutter-
äure

ysin

olamin

istamin

Abb. 11. HSEs von St. A und B bei pH=3,6



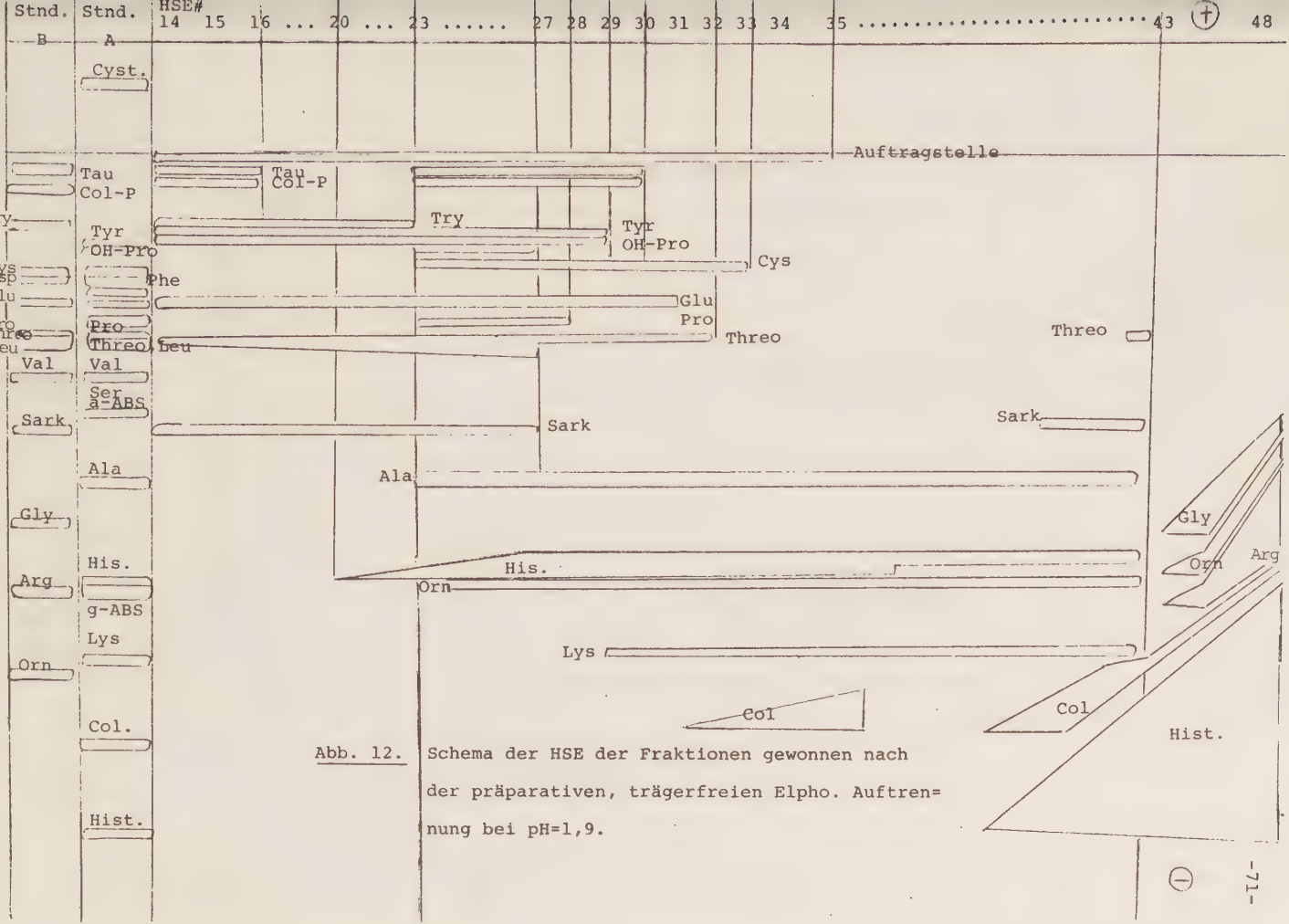


Abb. 12. Schema der HSE der Fraktionen gewonnen nach der präparativen, trägerfreien Elpho. Auftrennung bei pH=1,9.

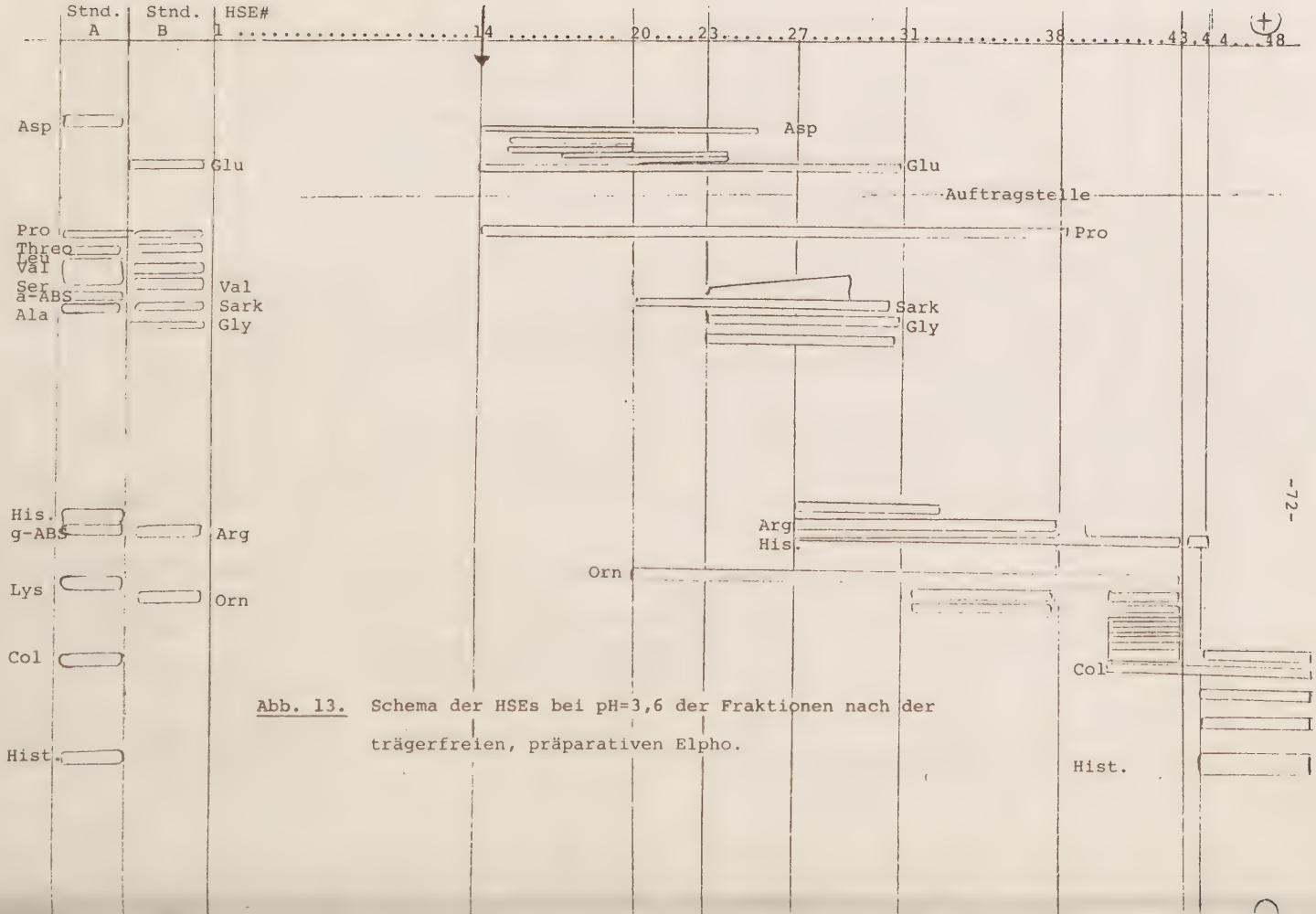


Abb. 13. Schema der HSEs bei pH=3,6 der Fraktionen nach der trägerfreien, präparativen Elpho.

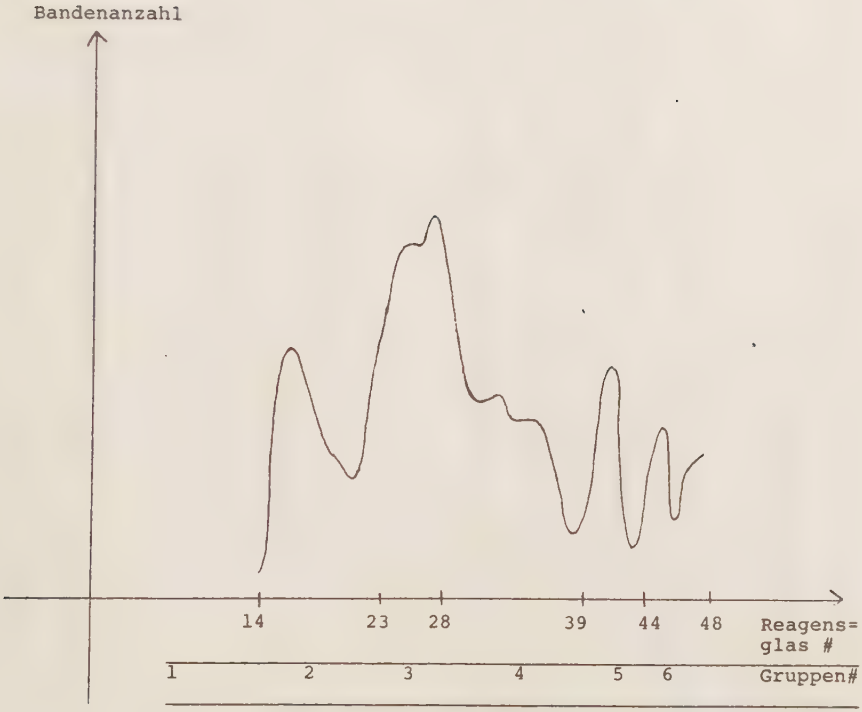


Abb. 14. Graphische Darstellung der Bandenzahlen der einzelnen Fraktionen nach der trägerfreien, Präparative Elpho nach Auftrennung durch die HSE bei pH=3,6.

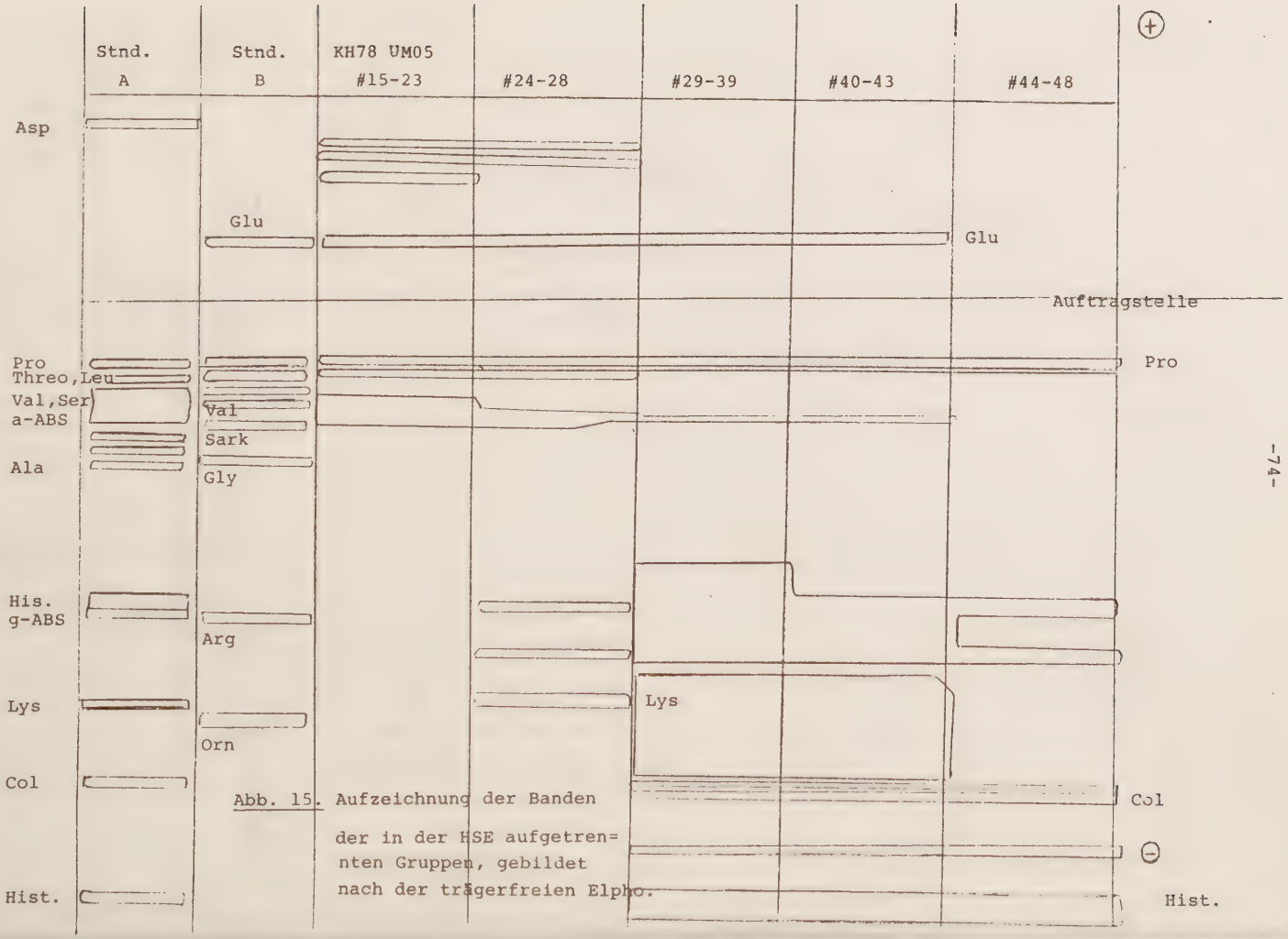


Abb. 15. Aufzeichnung der Banden der in der HSE aufgetrennten Gruppen, gebildet nach der trägerfreien Elpho.

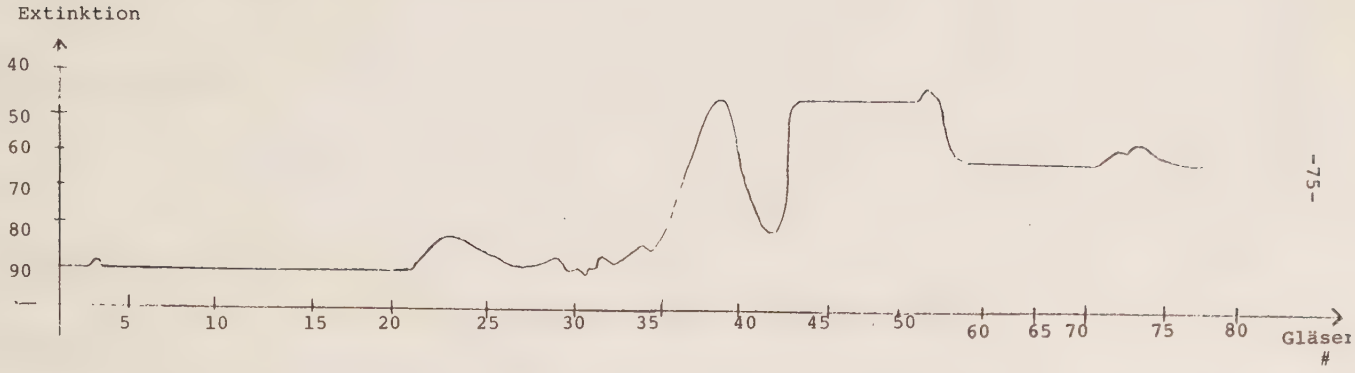


Abb. 16. Gelchromatographie mit Sephadex G 10 von der isolierten Substanzgruppe UM 05#15-23. Aufgezeichnete Kurve des Durchlaufanalysators. X-Achse= Nr. der Gläschen im Fraktionssammler. Y-Achse= Extinktion.

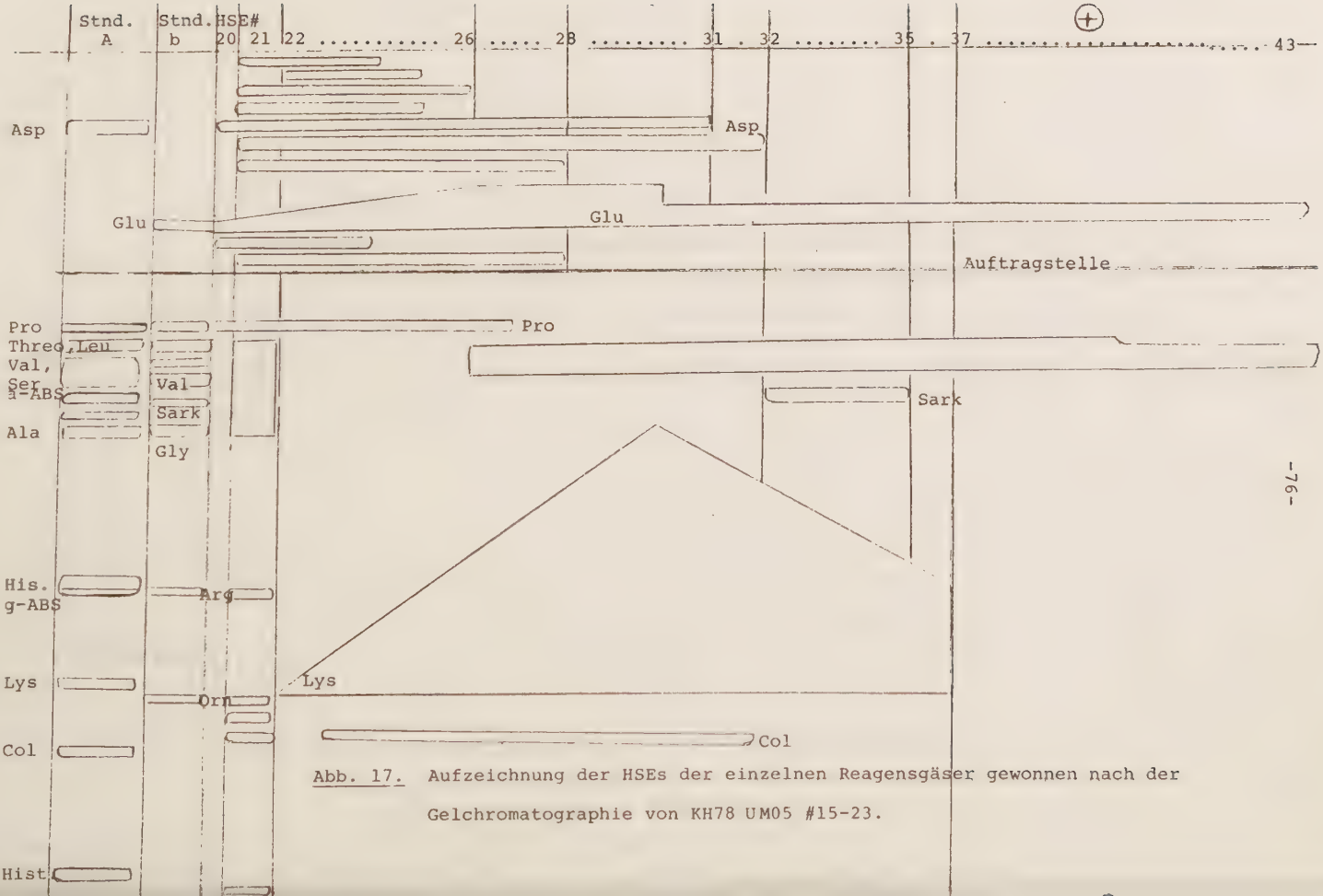


Abb. 17. Aufzeichnung der HSEs der einzelnen Reagensgäser gewonnen nach der Gelchromatographie von KH78 UM05 #15-23.

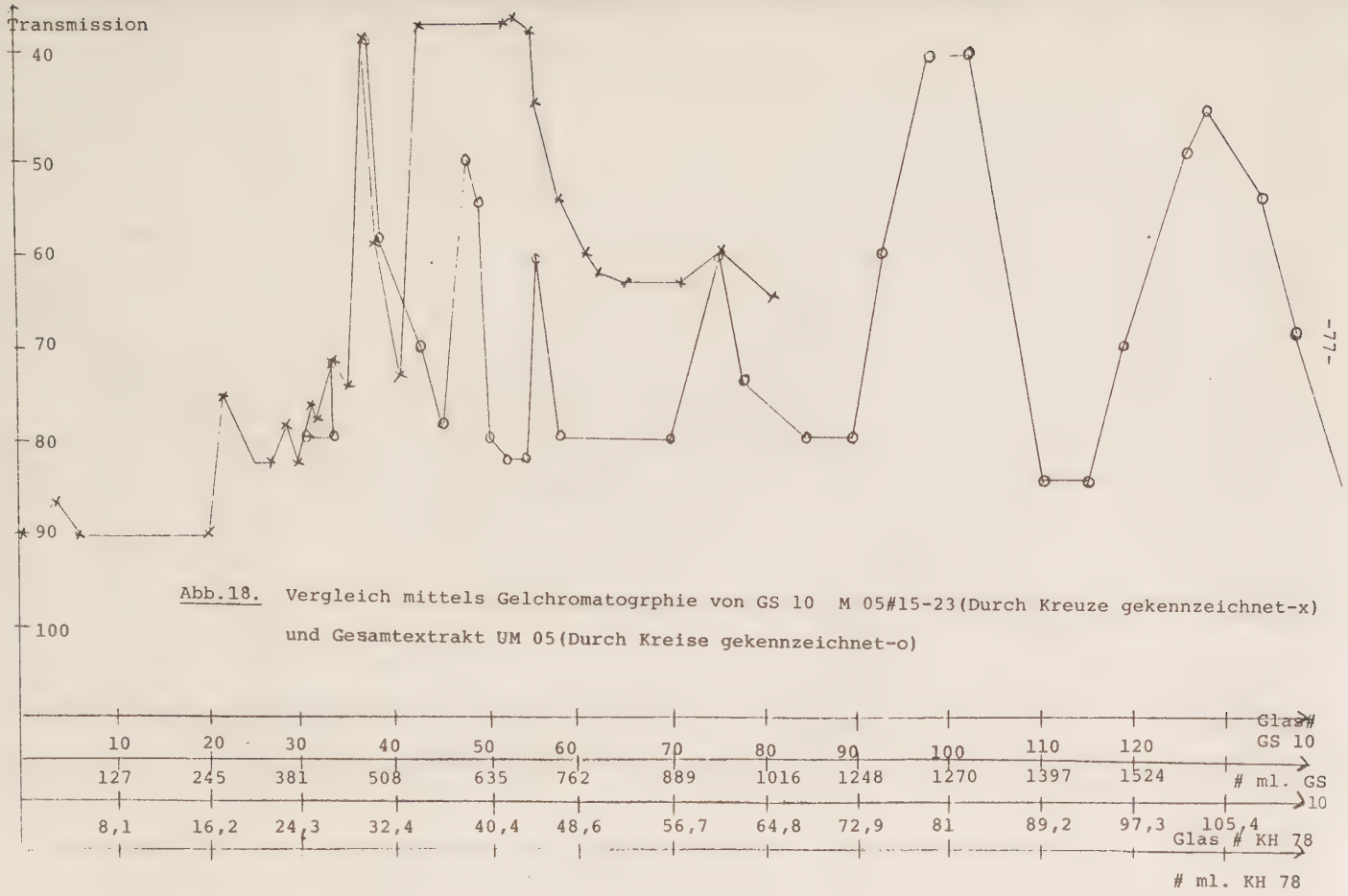


Abb.18. Vergleich mittels Gelchromatogrphie von GS 10 M 05#15-23(Durch Kreuze gekennzeichnet-x) und Gesamtextrakt UM 05(Durch Kreise gekennzeichnet-o)

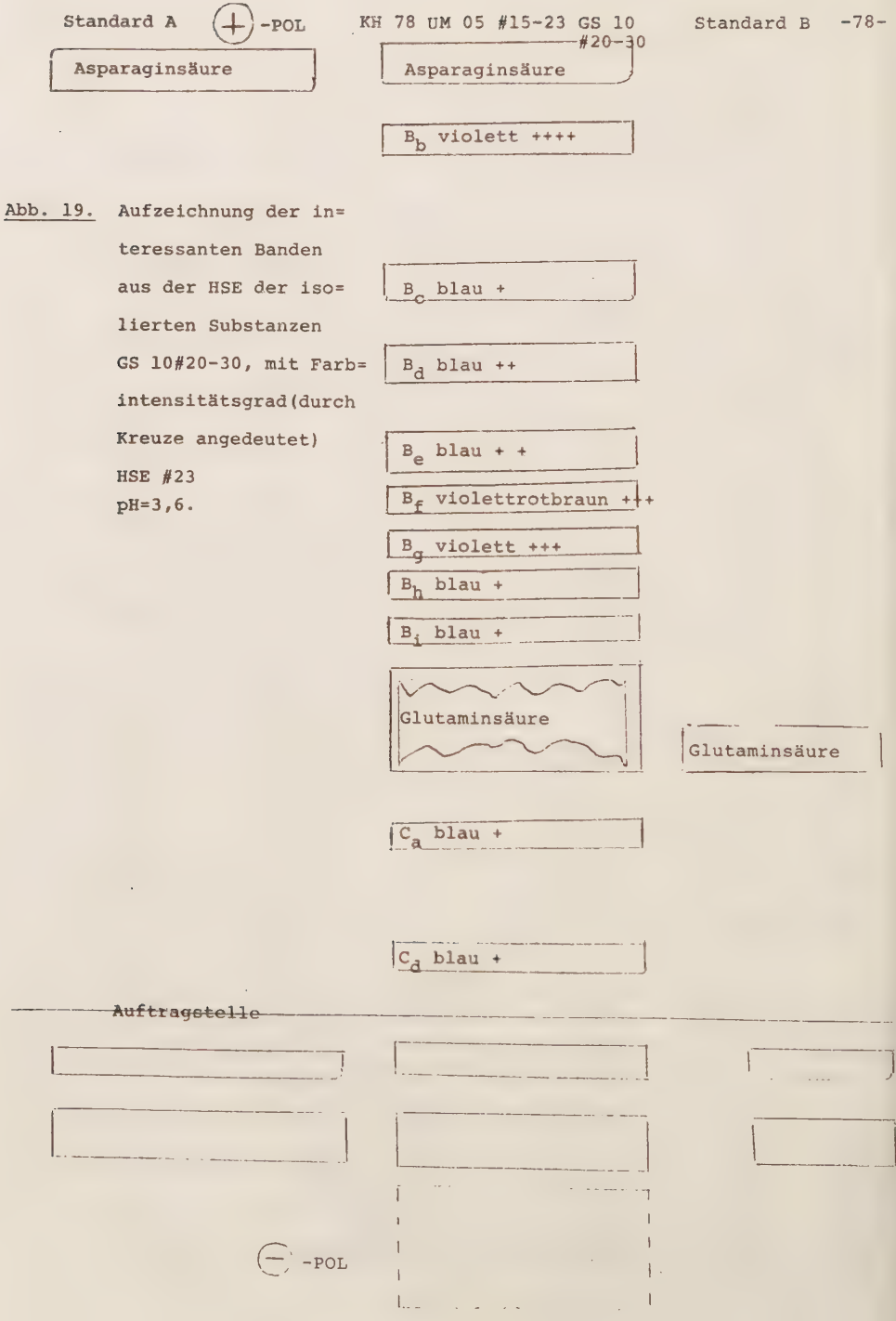


Abb. 19. Aufzeichnung der interessanten Banden aus der HSE der isolierten Substanzen GS 10#20-30, mit Farbintensitätsgrad(durch Kreuze angedeutet)
HSE #23
pH=3,6.

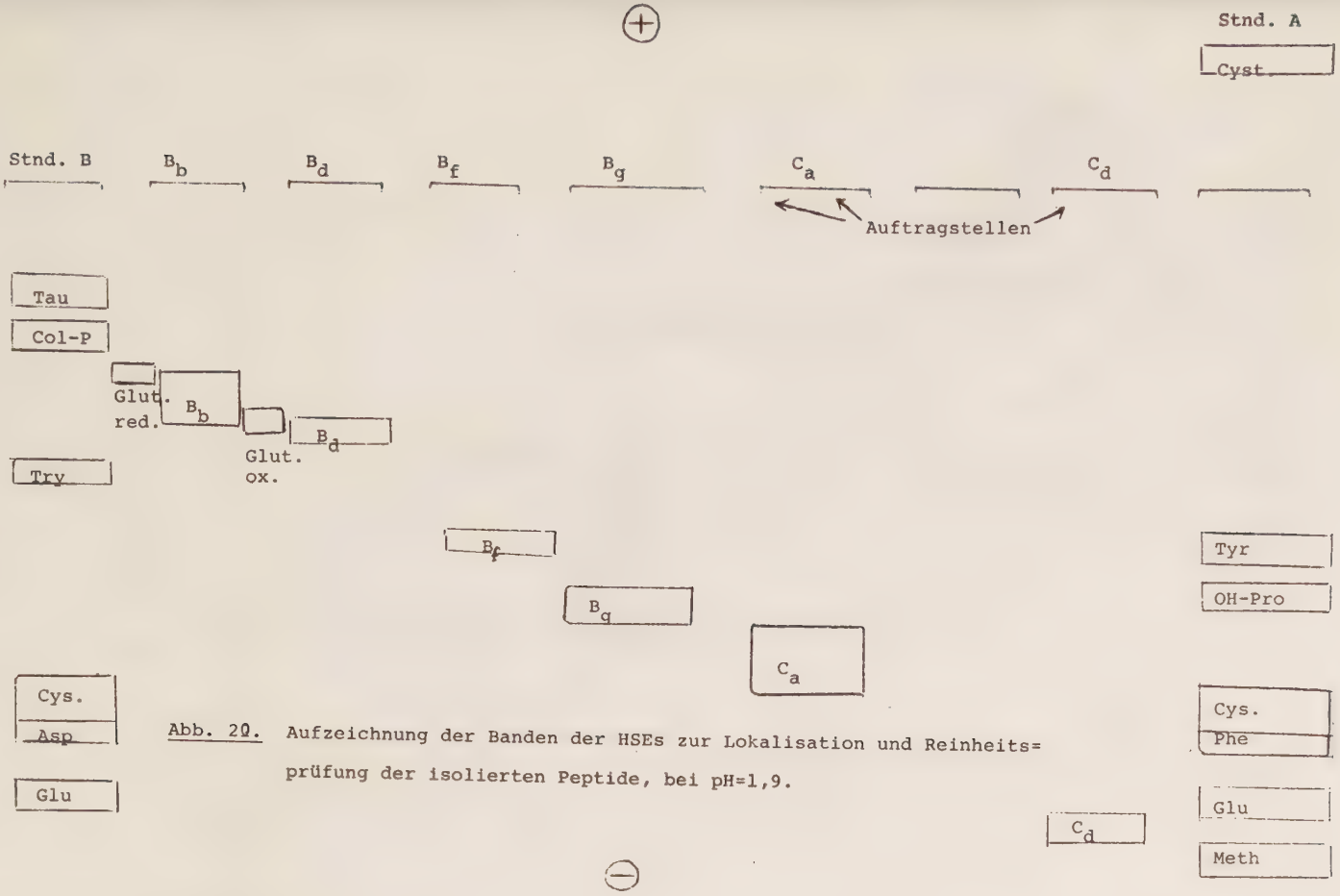


Abb. 20. Aufzeichnung der Banden der HSEs zur Lokalisation und Reinheits= prüfung der isolierten Peptide, bei pH=1,9.

Abb. 21. Va 1-Auftrennung der Standards A und B.

Abb.22. Va 2-Auftrennung von KH 78 UM 05 GS 10#30-60.

Abb. 23. Va 3- Auftrennung von Vollextrakt UM 05#15-23

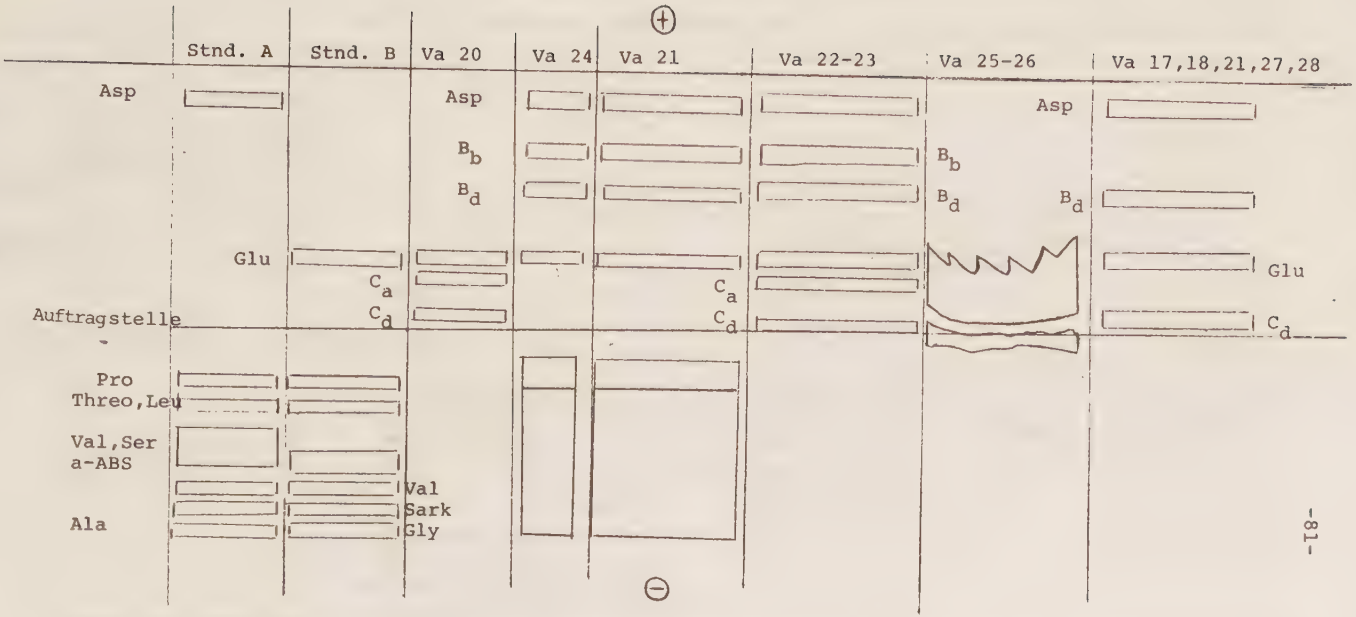


Abb. 24. Aufzeichnung der HSEs der einzelnen Vas mit Kennzeichnung der einzelnen interessierenden Peptidbanden (pH=3,6)

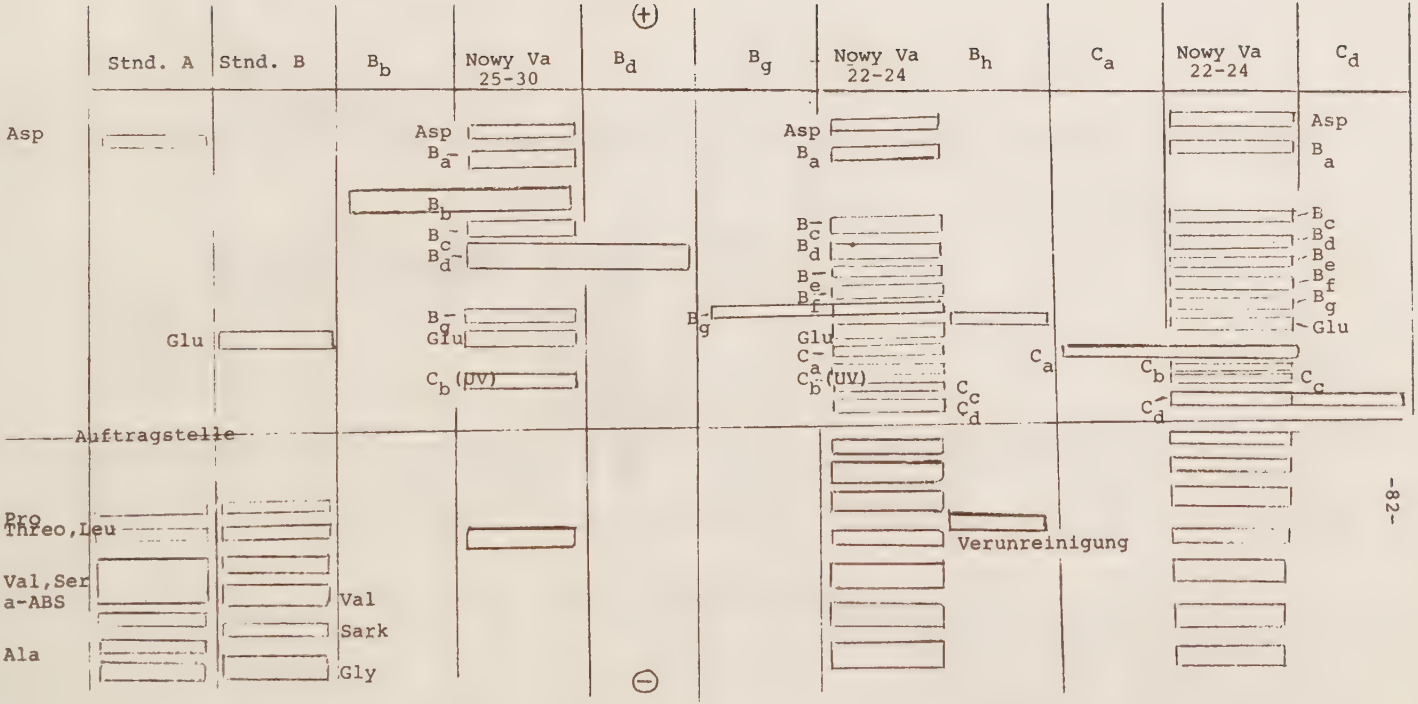


Abb. 25. Endgültige Reinheitsprüfung der isolierten Peptide bei pH=3,6 und eindeutige Identifikation der isolierten Substanzen durch Vergleich mit den isolierten Substanzen aus den Va's von Nowy

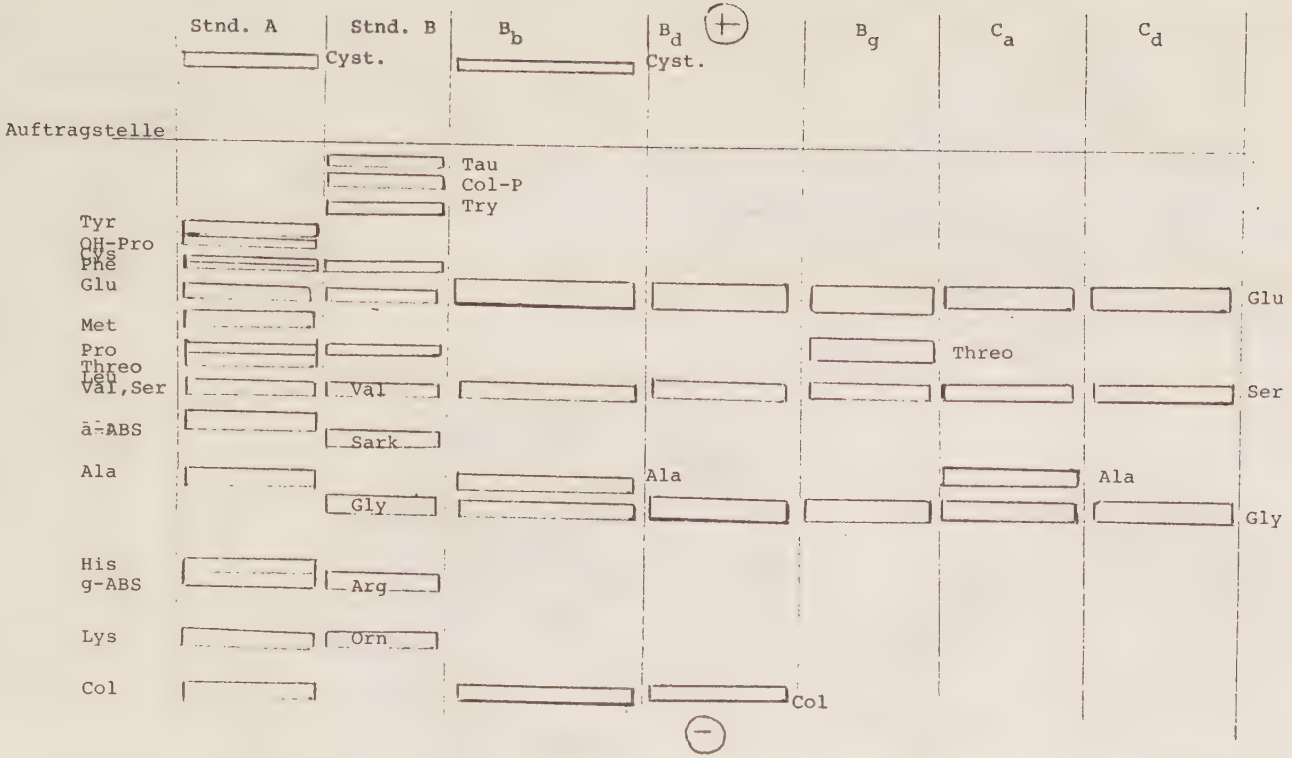
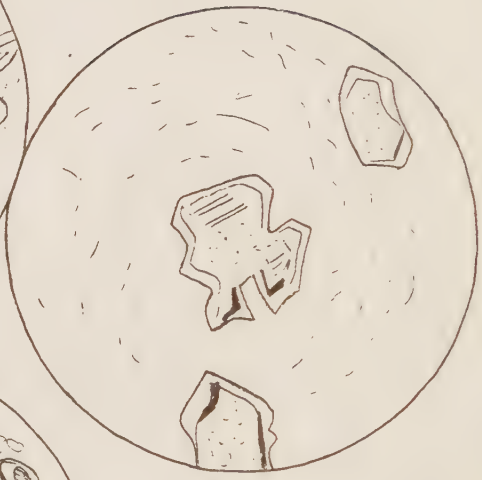
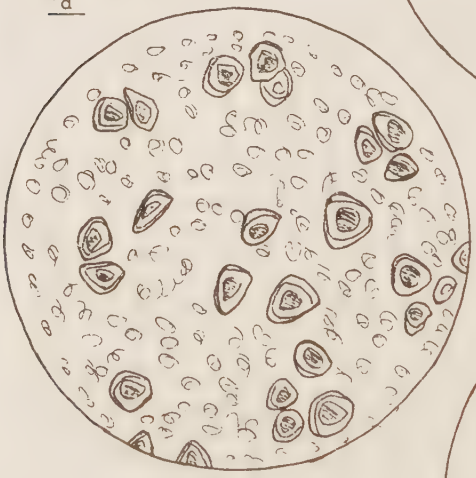


Abb. 26. Aufzeichnung der Bänder der HSEs vom Hydrolysat der isolierten Peptide bei pH= 1,9.

C_d



B_b



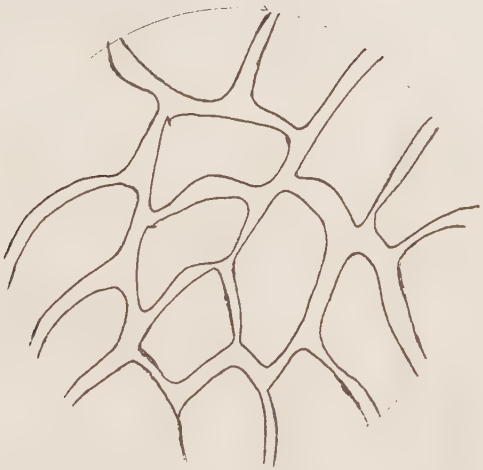
B_d

B_g

Abb. 27. Aufzeichnung der mikroskop= ischen Untersuchung der Peptide nach Kristallisation.

B_h

Abb. 28. Aufzeichnung der mikroskop= ischen Untersuchung der Peptide nach Kristallisation.



C_a

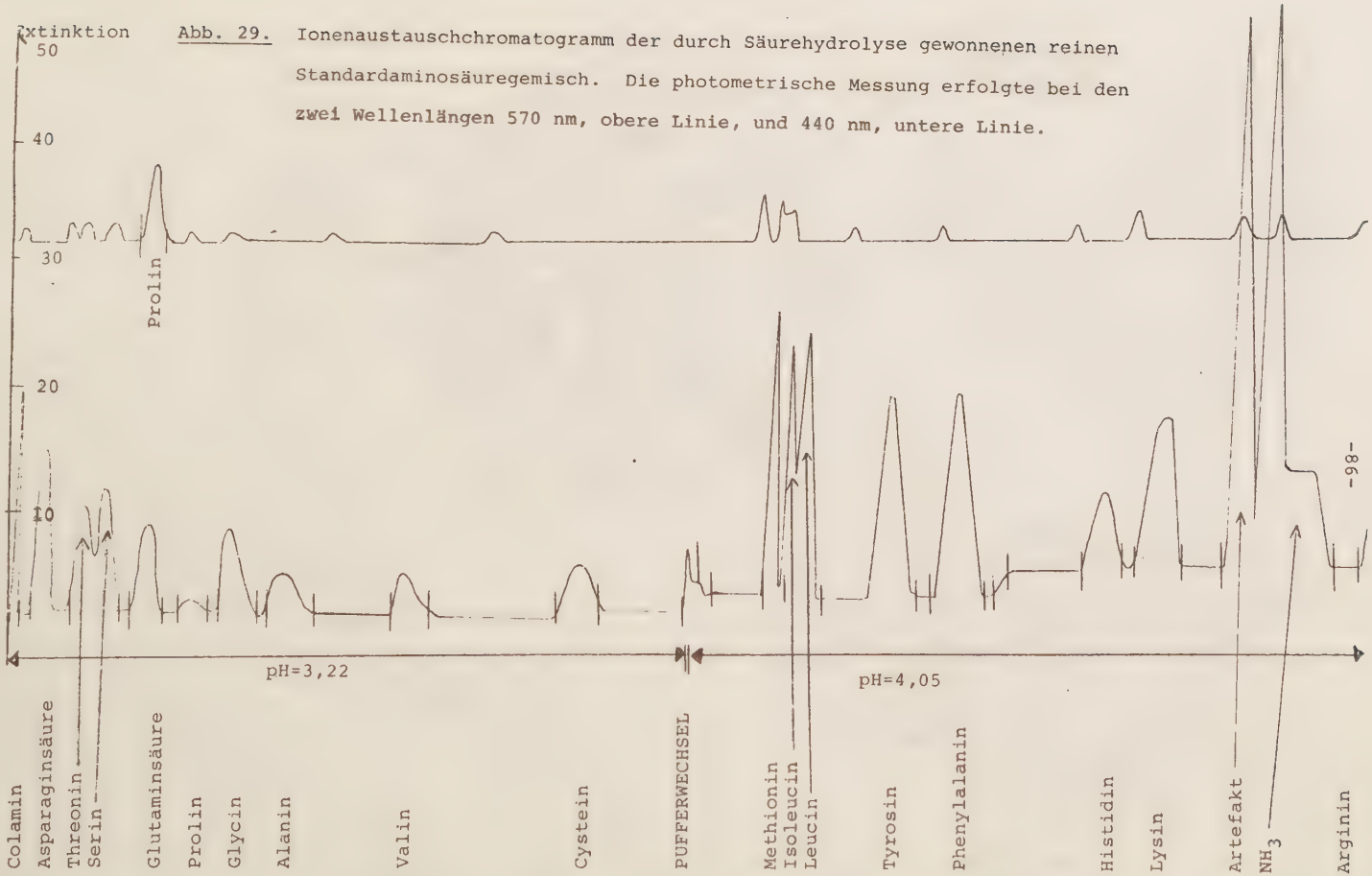


Abb. 29. Ionenaustauschchromatogramm der durch Säurehydrolyse gewonnenen reinen Standardaminosäuregemisch. Die photometrische Messung erfolgte bei den zwei Wellenlängen 570 nm, obere Linie, und 440 nm, untere Linie.

Abb. 30. Aufzeichnung der ermittelten Kurven nach der Ionenaus= tauschchromatographie, mit Standardkurve als Vergleich.

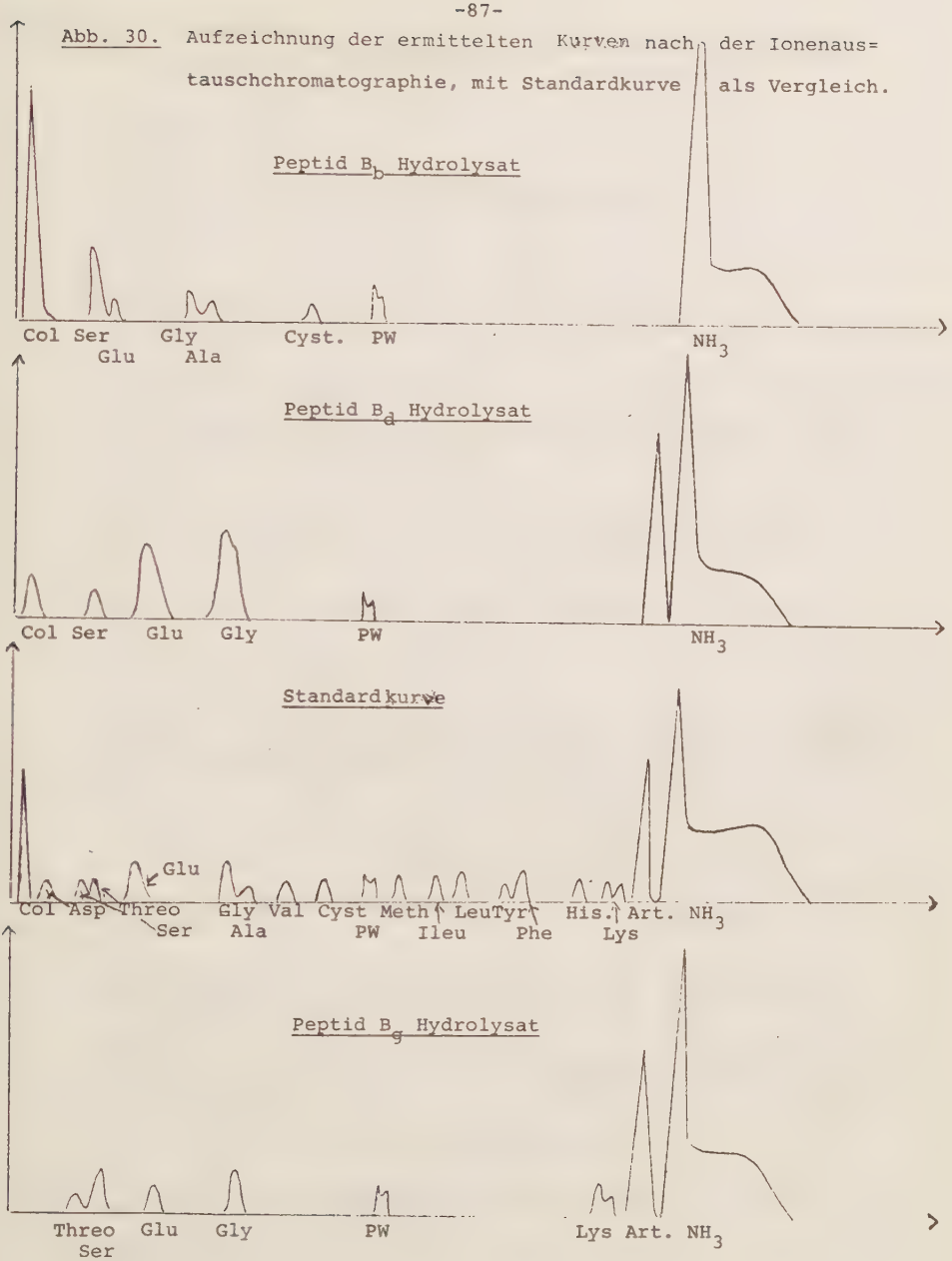
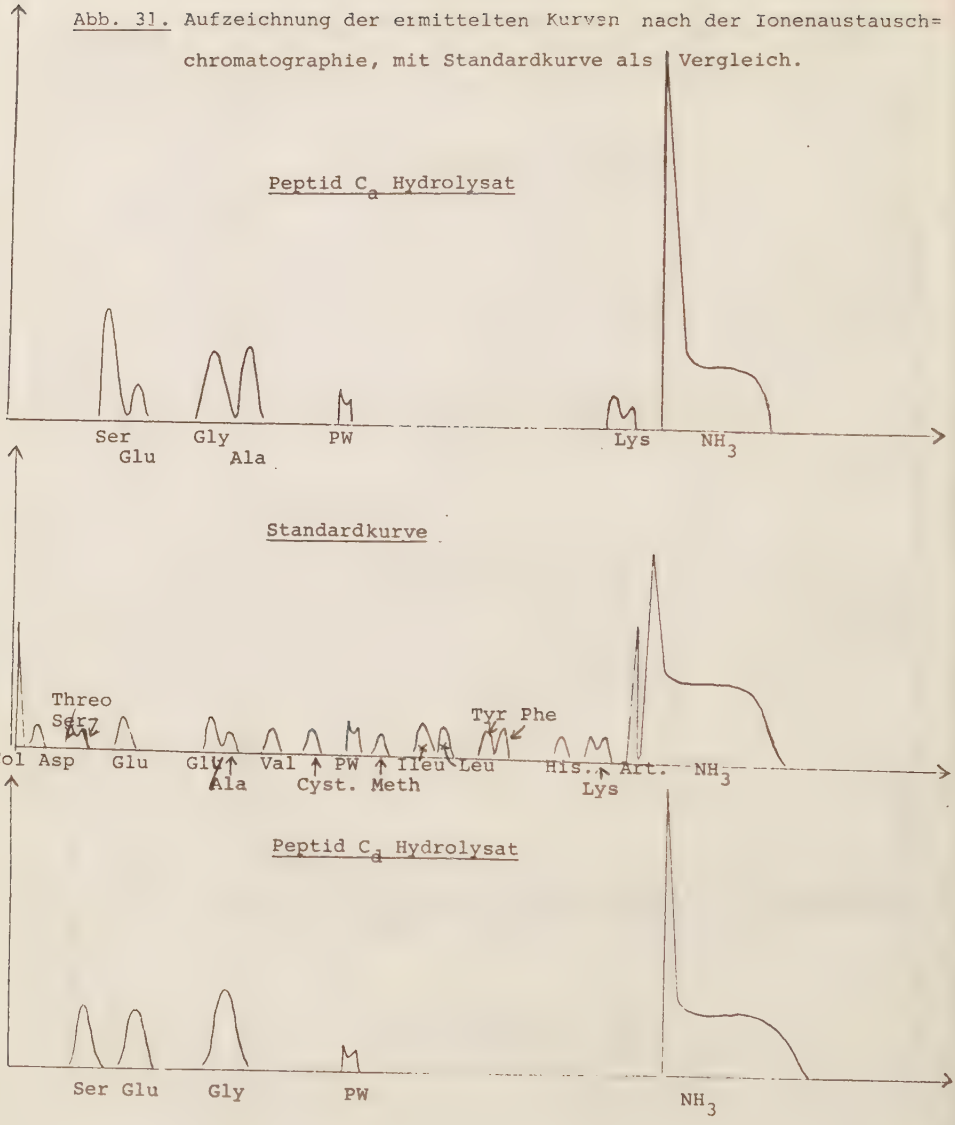


Abb. 31. Aufzeichnung der ermittelten Kurven nach der Ionenaustausch-chromatographie, mit Standardkurve als Vergleich.



LITERATURAUSWAHL

1. AMICON GmbH: Ultrafiltration- Anleitung und Katalog(Pub. 426). Witten, Ruhr.

2. ANDREWS, P.: The estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel filtration. Biochemical Journal 91: 222(1964).

3. ANDREWS, P.: The estimation of the molecular weights of proteins by sephabdex gel filtration. Biochemical Journal 96: 595(1965).

4. BAILEY, N.: The Protein Chemistry and Biological Activity and Methods. Band II Teil B 1954.

5. BAUER, H.: Elektrophoretische und Immunoelektrophoretische Studien über Muskelproteine. 1964.

6. BECKMAN INSTRUMENTS: Beckman Instruction Manual Model 12-65. Beckman Instruments March 1966.

7. BISSERTE, G., P. Paysant: Papierchromatographische Bestimmung von Aminosäuren und Polypeptiden im Biologischen Milieu, normales und pathologisches Gewebe. Bulletin Societe Chimie biologique 40: 2067(1958).

8. BLATT, F.: Fractination of protein solutions by membrane partition chromatography. Nature 216: 511-513(1967).

9. BLATT, W.F.: Protein Solutions- Concentration by a rapid method. Science 150: 224(1965).

10. BUBL, R.: Isolierung und Analyse eines Peptids aus dem Kalbsmyokard mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese und der Gelchromatographie. Dissertation München 1972.

11. BUCZKO, P., R. Franco, G. Bianchetti, M.B. Donati, G. De gaetano, G. Garattini: Posiitive chronotropic effect of dialysable peptides derived from plasmin digestion of bovine fibrinogen preparations. European Journal of Pharmacology 36(2): 355-361(1976).

12. CAMAG: Hochspannungselektrophorese- Literatur D. CAMAG Literatur= information 1969.

13. CLOTTEN, R., A. Clotten: Hochspannungselektrophorese- Ihre Anwendungsmöglichkeiten für biochemische und klinisch-chemische Trennungsprobleme: 140. Georg Thieme Verlag 1962.

14. CONSDEN, R. A.J.P. Martin, A.H. Gordon, R.L.M. Synge: Ionophoreses in Silica Jelly. A Method for the separation of amino acids and peptides. Biochemical Journal 40: 33(1946).

15. CUTTING, H.: Handbook of Pharmacology. University of Hawaii: 38-43. Meredith Corporation, New York 1972.

16. DONHÄUSER, S.: Über hydrolysierbare ninhydrinpositive Bestandteile des Myokards. Dissertation München 1968.

17. DORFNER, K.: Ionenaustauscher 3. Auflage: 250-252. De Gruyter, Berlin 1970.

18. EINHÄUPL, K.: Über die Isolierung niedermolekularer Substanzen (MG 500-1000) aus dem Kalbsmyokard und deren Wirkung auf dem Kreislauf des Kaninchens. Dissertation München 1975.

19. ENZLER, H.B.: Isolierung und Analyse eines Peptids aus dem Kalbsmyokard mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese, der Gelfiltration und der Dünnschichtchromatographie. Dissertation München 1972.

20. ERDÖS, G., N. Backan: Hypotensive Peptides: 451-453. Springer Verlag, Berlin, New York 1966.

21. GALLO,P.: New data on the biochemistry of the heart muscle tissue as evidenced by a cytological method applicable to toxo= cological and pharmacological method research work. Supplement Cardiologica 41. Basel 1962.

22. GLENN, T.: Production of a myocardial depressant factor in cardiogenic shock. American Heart Journal 12, number 1: 78-85 (1971).

23. HAIß, F.: Isolierung einer ninhydrinpositiven hydrolysierbaren Substanz aus dem Kalbsmyokard. Dissertation München 1973.

24. HANNIG, K.: Techniques of Biochemical and Biophysical Morphology. Band 1: 192.230, 1969.

25. HANNIG, K., H. Grassman: Trennung von Stoffgemischen auf Filter= papier durch Ablenkung im elektrischen Feld. Zeitschrift für physiologische Chemie 292 Band 1: 1-50(1953).

26. HARMANN, J.W.: The cytochondria of cardiac and skeletal muscle. International Review of Cytology 5: 89-142(1956).

27. HETENEY, E.: Protein Content of Normal Striated Muscle of Various Types. Acta Physiologica Scandinavia 41: 140.144(1957).

28. HICKLING, M.J., J.A. Barclay, S.J. White, K. White: Isolation of sodium-complexing polypeptides from mammalian blood and cardia muscle. Experentia 32: 554-555(1976).

29. HUGHES, B.D.: The Electrophoresis of some human muscle proteins on starch gels. Biochemical and biophysical Research Communications 195: 194-204(1959).

30. HULSMANS, H.A.M.: Verdeling van Enymactivitaeiten bij Fractionening von Hartspierweffsel. Klein offset Krukkeriz, Poortbers Holland 1960.

31. ILETT, K.F.: A renally active Substance from Heart Muscle and from Blood. Journal of Physiology 196: 101-109(1968)-

32. KENDALL, J., E.D. Crittendon: Proceedings of the national Academy of Sciences Vol. 9: 75. USA(1923).

33. KOTHNY, K.: Hochspannungselektrophoretische Untersuchungen der freien Aminosäuren des Kalbsherzens. Dissertation München 1968.

34. KRONMANN, M.J., R.J. Winterbottom: Post mortem changes in the water soluble proteins of bovine skeletal muscle during agigng and freezing. Journal of Agricultural Food Chemistry 8: 62-67(1960).

35. LANG, E. Leinarzt, G., G. Siebert: Handbuch der physiologischen und pathologischen chemischen Analyse für Biologen und Chemiker. Band I. Springer Verlag, Berlin, New York 1953.

36. LAURENT, T., J. Killander: Theory of gel filtration. Journal of Chromatography 14: 317-330(1964).

37. MACKENZIE, A.P., B.J. Luyet: Freezedrying and protein denaturation in muscle tissues, losses in protein solubility. Nature 214: 83(1967).

38. NEILANDS, J.B., P.K. Strump: Fondamenti die enzimologia. Pensiero Scientifico, Roma 1956.

39. RAAB, W., E. Bajusz, G. Rona: Myocardiology. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1972.

40. READER, R., G. Kolos, J.F. Williams: The Myocardium.: Biochemical Studies on Myocard Hypertrophy and Metabolic Support of the Acutely Stressed Myocardium.: 106-116. Karger Verlag, Basel 1974.

41. REES, M.W.: The estimation of Threonine and Serine in Proteins. Biochemical Journal 40:632(1946).

42. SCHMÜCK, H.: Über ein niederes Peptid aus dem Kalbsherzextrakt. Dissertation München 1971.

43. STRAIN, H.H., J.C. Sullivan: Advances in Chromatography. Analytical Chemistry 23: 816(1956).

44. SZENT-GYÖRGY: La natura della vita e la chimica della contrazione muscolare. Einaudi, Torino 1951.

45. TJUTCEV, N., P. Mäsiar: The Metabolism of Protein Substances in Muscle Tissue. A Study of the ninhydrinpositive Substances isolated from nonprotein extracts from the heart of normal rats. Physiological Bohem. 13: 565(1964).

Vielen herzlichen Dank Herrn Prof. Dr. med. H. Nowy für seine freundliche Hilfe und Mitarbeit.

Auch herzlichen Dank Herrn Dr. med. Fink, PD an dem Institut für Klinische Chemie für seine Hilfe bei der Ionenaustauschchromatographie.

Dank auch meiner lieben Frau Regina für ihre große Unterstützung

LEBENSLAUF

Name: Hans J. Hatz

geboren am: 9.4.1954

in: Chicago, Illinois USA

Eltern: Dr. med. Rudolf Hatz und Dr. med. Hilde Hatz, geb. Müller

Schulen: 1960-1964 Queen of all Saints School, Chicago

1964-1968 Hardey Preparatory School for Boys, Chicago

1968-1970 St. Ignatius High School for Boys, Chicago

1970-1973 Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium am Staatlichen Landschulheim Marquartstein, Bayern

1972-1975 Loyola University of Chicago, pre-medical school

Studium: 1975-1981 an der Ludwig-Maximilians Universität München

Staatsexamen: 7.5.1981

Approbation: